



Relation fonctionnelle entre le pool de nucléotides et PARP-1 : une nouvelle source d'instabilité génétique

Simon Gemble

► To cite this version:

Simon Gemble. Relation fonctionnelle entre le pool de nucléotides et PARP-1 : une nouvelle source d'instabilité génétique. Biologie cellulaire. Université Paris Saclay (COMUE), 2015. Français. NNT : 2015SACLS244 . tel-01333204

HAL Id: tel-01333204

<https://theses.hal.science/tel-01333204>

Submitted on 17 Jun 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A L'UNIVERSITE PARIS-SUD**

ECOLE DOCTORALE N° 582

CBMS Cancérologie : biologie - médecine - santé

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Par Simon Gemble

**RELATIONS FONCTIONNELLES ENTRE LE POOL
DE NUCLEOTIDES ET PARP-1 : UNE NOUVELLE
SOURCE D'INSTABILITE GENETIQUE**

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 16 Décembre 2015 :

Composition du jury :

Directrice de thèse :	Mounira Amor-Guéret	Directrice de recherche au CNRS
Président du jury :	Simon Saule	Professeur à l'Université Paris-Sud
Rapporteurs :	Valérie Schreiber	Directrice de recherche au CNRS
	Jean-Sébastien Hoffmann	Directeur de recherche à l'INSERM
Examineurs :	Bernard Lopez	Directeur de recherche au CNRS
	Christian Jaulin	Directeur de recherche à l'INSERM

A la mémoire de mon oncle, Alain

TABLE DES MATIERES

Remerciements	p.9
Liste des tableaux, figures et abréviations	p.11
AVANT-PROPOS	p.19
INTRODUCTION	p.21
<u>Chapitre 1 : Les hélicases RecQ et syndromes associés à leur déficience</u>	p.23
1. La famille des hélicases RecQ	p.25
1.1 Domaines	p.25
1.1.1 Le domaine hélicase	p.26
1.1.2 Le domaine RQC	p.26
1.1.3 Le domaine HRDC	p.27
1.2 Fonctions cellulaires : les gardiennes du génome	p.27
1.2.1 RecQ et réplication	p.28
1.2.2 RecQ et recombinaison homologue	p.29
1.2.3 RecQ et points de contrôle de phase S	p.31
1.3 Syndromes associés à la déficience en hélicases RecQ	p.32
1.3.1 WRN et le syndrome de Werner	p.32
1.3.2 RecQ4 et syndromes associés	p.33
2. Le syndrome de Bloom	p.34
2.1 Phénotypes cliniques et pathologies associées	p.34
2.2 Prédisposition aux cancers	p.35
2.3 Caractéristiques cellulaires	p.36
2.3.1 Caractéristiques cytogénétiques	p.36
2.3.2 Stress oxydant	p.38
2.3.3 Anomalies de la réplication	p.38
2.3.4 Anomalies mitotiques	p.39
3. La protéine BLM	p.42
3.1 Mutations connues	p.42
3.2 Substrats de BLM	p.43
3.3 Expression de BLM	p.44
3.4 Localisation de BLM	p.46
3.5 Partenaires de BLM	p.47
3.5.1 La topoisomérase III α	p.47
3.5.2 RMI1 et RMI2	p.48
3.5.3 RPA	p.48
3.5.4 La topoisomérase II α	p.49
3.5.5 La recombinase RAD51	p.49

3.6 Fonctions de BLM	p.50
3.6.1 BLM et stress de réplication	p.50
3.6.2 BLM et réplication	p.52
3.6.3 BLM et recombinaison homologue	p.54
3.6.4 BLM et « <i>non homologous end joining</i> »	p.56
3.6.5 BLM et télomères	p.58
3.6.6 BLM et mitose	p.59
3.6.6.1 Phosphorylation de BLM	p.59
3.6.6.2 BLM aux centromères	p.60
3.6.6.3 BLM et anomalies mitotiques	p.61
4. Signature transcriptomique de l'absence de BLM	p.62
4.1 L'hypothèse « <i>SOS-like</i> »	p.62
4.2 Profil d'expression des gènes en absence d'une protéine BLM fonctionnelle	p.64
 <u>Chapitre 2 : Pool de nucléotides, cytidine désaminase (CDA) et instabilité génétique</u>	 p.67
1. Métabolisme et régulation du pool de nucléotides	p.69
1.1 Base azotées, nucléosides et nucléotides	p.69
1.2 La voie de synthèse <i>de novo</i>	p.70
1.3 La voie de « sauvetage » ou de « recyclage »	p.73
1.4 Le catabolisme des nucléotides	p.75
1.5 Caractéristiques du pool de nucléotides	p.75
1.5.1 Taille du pool de nucléotides	p.75
1.5.2 Compartimentation du pool de nucléotides	p.76
1.5.3 Régulation au cours du cycle cellulaire	p.77
1.5.4 Régulation lors de dommages de l'ADN	p.80
2. Le pool de nucléotides : une cible en cancérologie	p.83
2.1 Analogues utilisés en clinique	p.83
2.2 Mécanismes d'action	p.84
2.3 Résistance à ces analogues	p.86
3. Déséquilibre du pool de nucléotides	p.88
3.1 Analogues utilisés en clinique	p.88
3.2 Déséquilibre du pool de nucléotides et fidélité de la réplication	p.91
3.3 Déséquilibre du pool de nucléotides et vitesse de réplication	p.93
3.4 Déséquilibre du pool de nucléotides et cassures chromosomiques	p.93
3.5 Déséquilibre du pool de nucléotides et cycle cellulaire	p.94
3.6 Déséquilibre du pool de nucléotides et oncogènes	p.95
3.7 Nucléotides et pathologies humaines	p.96
4. Cytidine désaminase (CDA) et instabilité génétique	p.98
4.1 Activité enzymatique de la CDA	p.98
4.2 Localisation et expression de la CDA	p.101

4.3 CDA et drogues anti-cancéreuses	p.102
4.4 CDA et syndrome de Bloom	p.105
 <u>Chapitre 3 : PARP-1, une enzyme multifonctionnelle</u>	 p.109
1. La famille des PARPs	p.111
1.1 Domaines et rôles	p.111
1.1.1 Les PARPs dépendantes de l'ADN	p.111
1.1.2 Les tankyrases	p.115
1.1.3 Les PARPs CCCH	p.116
1.1.4 Les Macro-PARPs	p.116
1.1.5 Les « autres » PARPs	p.117
1.2 Métabolisme de l'ADP-Ribose	p.118
1.2.1 Réaction de synthèse de l'ADN-Ribose	p.118
1.2.2 Réaction de dégradation de l'ADP-Ribose	p.121
1.2.3 Interaction non covalente avec l'ADP-Ribose	p.123
2. La protéine PARP-1 : généralités	p.126
2.1 Domaines de PARP-1	p.126
2.1.1 Le domaine N-terminal	p.126
2.1.2 Le domaine central	p.126
2.1.3 Le domaine C-terminal	p.127
2.2 Activité enzymatique de PARP-1	p.127
2.3 Régulation de l'activité de PARP-1	p.130
2.3.1 Régulation de PARP-1 via des modifications post-traductionnelles	p.130
2.3.2 Enzyme du métabolisme du NAD ⁺	p.132
3. Les fonctions de PARP-1 liées à la réparation de l'ADN	p.136
3.1 PARP-1 et systèmes de réparation de l'ADN	p.136
3.1.1 Réparation des CSBs	p.137
3.1.2 « <i>Non-homologous end joining</i> » (NHEJ)	p.138
3.1.3 Recombinaison homologue et réplication	p.140
3.2 PARP-1 et remodelage de la chromatine	p.142
4. Les fonctions de PARP-1 liées à la cancérogénèse	p.144
4.1 PARP-1 et inflammataion	p.145
4.2 PARP-1, mort cellulaire et métabolisme énergétique	p.147
4.3 PARP-1 et angiogénèse/métastase	p.149
4.4 PARP-1 et régulation du cycle cellulaire	p.150
4.5 PARP-1 et régulation transcriptionnelle	p.153
4.6 PARP-1 et hormones sexuelles	p.156
4.7 Cibler PARP-1 dans le traitement des cancers	p.157
 <u>PRESENTATION DU PROJET DE RECHERCHE</u>	 p.161

RESULTATS	p.175
Partie 1 : Le déséquilibre du pool de pyrimidines induit par la déficience en CDA inhibe l'activité de PARP-1 conduisant à la réplication incomplète de l'ADN	p.177
Partie 2 : La déficience en CDA entraîne une diminution de l'efficacité des points de contrôle dépendants de Chk1, favorisant la formation d'UFBs	p.219
Partie 3 : L'activité de PARP-1 participe à la séparation correcte des chromatides sœurs avant l'anaphase	p.235
Partie 4 : BLM et résolution des UFBs au cours de la mitose	p.247
DISCUSSION	p.253
Régulation de l'activité de PARP-1 par la dCTP	p.255
PARP-1 et phénotype Bloom	p.258
Les UFBs correspondent à des séquences d'ADN non répliquées perdurant en mitose	p.260
Surveillance de l'ADN non répliqué par les points de contrôle	p.263
Conséquences de la présence de séquences d'ADN non répliquées en mitose	p.266
CONCLUSIONS & PERSPECTIVES	p.270
ANNEXES	p.273
Voies de biosynthèse des nucléotides	p.275
Pathologies associées à des désordres métaboliques des purines ou pyrimidines	p.283
Voies de biosynthèse du NAD ⁺	p.287
Descriptions des modèles cellulaires utilisés au laboratoire	p.289
Les hélicases BLM et PICH coopèrent avec la topoisomérase II α dans la disjonction des centromères avant l'anaphase	p.291
Listes de mes autres articles scientifiques sans lien direct avec mon sujet de thèse et résumés associés	p.307
BIBLIOGRAPHIE	p.311

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les différents organismes qui m'ont accueilli et financé durant ma thèse (l'Institut Curie, le CNRS, le MESR, l'université Paris-Sud et l'ARC).

Je remercie également l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Merci au Professeur Simon Saule de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury, merci aux Docteurs Valérie Schreiber et Jean-Sébastien Hoffmann d'avoir accepté d'être rapporteurs, et merci aux Docteurs Bernard Lopez et Christian Jaulin d'avoir accepté d'être examinateurs de ce travail. Merci également aux Docteurs Meng-Er Huang, Fatima Mechta-Grigoriou, Bernard Lopez et Sarah Lambert pour avoir participé à mes comités de thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement ma directrice de thèse, le Docteur Mounira Amor-Guérét. Je te suis extrêmement reconnaissant de m'avoir aussi bien encadré, formé et conseillé tout au long de ces quatre années de thèse ; toujours avec autant d'énergie et de simplicité dans tes rapports humains. Merci d'avoir su toujours prendre du temps pour discuter avec moi, même lorsque tu étais débordée. Tu as aussi su entretenir ma passion pour la recherche malgré les passages à vide que j'ai pu traverser quelques fois. Ton exigence a toujours été pour moi une motivation pour me dépasser et chercher à m'améliorer. Merci de m'avoir formé au métier de chercheur et de m'avoir toujours donné ma chance. Nos conversations, parfois animées mais toujours enrichissantes, me manqueront à l'avenir.

Je voudrais également remercier le Docteur Sarah Lambert pour son implication durant toute ma thèse. Je te remercie sincèrement pour le temps que tu m'as consacré et l'intérêt que tu as toujours porté à mes travaux. Tes suggestions et ton aide précieuse ont été deux atouts majeurs pour faire aboutir ce projet. Je te remercie de m'avoir aussi bien conseillé, autant d'un point de vue professionnel que personnel. Merci pour nos longues conversations toujours aussi stimulantes et enrichissantes lorsque je venais te voir « juste pour cinq minutes ».

Merci au Docteur Laurence Dubrez-Daloz qui m'a initié lors de mes premiers pas dans le monde de la recherche et qui a su m'apprendre les bases du métier de chercheur. Merci pour tes conseils et pour ton soutien, même aujourd'hui alors que j'ai quitté ton équipe depuis quatre ans.

Je voudrais aussi remercier toutes les personnes de l'équipe pour leur bonne humeur et leur soutien : ce fut un vrai plaisir de travailler à vos côtés ! Je tiens à remercier particulièrement mes deux partenaires de bureau : Géraldine et Rosine. Un énorme merci à Géraldine sans qui ma thèse n'aurait pas été ce qu'elle est aujourd'hui. Je n'oublierai pas ton aide inestimable dans ce projet, qui est finalement aussi le tien. Je te suis extrêmement reconnaissant d'avoir su m'écouter (me plaindre), me conseiller et me rassurer tout au long de ma thèse. Ta gentillesse extrême fait de toi une personne exceptionnelle. Tu as toute mon amitié. Sans oublier que tu as également été mon acolyte bilingue, ne fuyant bien sûr jamais devant une conversation en anglais ! Nos taquineries (« non je ne suis pas maniaque et oui un jour tu réussiras un western blot ») et nos « papotages » vont vraiment me manquer ! Merci à toi Rosine, pour tes conseils, ton implication dans la vie du laboratoire et ta gentillesse. Tu as toujours su être disponible pour répondre à mes questions « bêtes » et pour écraser les insectes qui nous terrorisaient Géraldine et moi ! Merci à toi, Elias, pour avoir su m'écouter lorsque je venais te voir dans ton bureau avec un café, merci de ton soutien lorsque je n'allais pas bien et

merci de ton amitié. Tu as su être présent lorsqu'il le fallait. Je suis presque jaloux que tu ai découvert une nouvelle classe d'UFB ! J'espère que tes efforts et ton acharnement se solderont par un très bon article ! Merci à toi, Hamza, pour tes conseils, ta gentillesse et ton humour toujours discret. Les liens entre CDA et cancers n'auront bientôt plus de secret pour toi ! Bon courage pour l'étape de publication et surtout je te souhaite plein de bonheur dans ton nouveau job de papa. Bon courage à toi Sandra, tu as toutes les capacités pour faire une bonne thèse, reste déterminée et NAMPT n'aura plus de secret pour toi ! Merci à Vincent et Alexis pour leur gentillesse lorsque je suis venu (souvent) leur poser des questions sur PARP-1. Bon courage à toi aussi Alexis pour ta thèse, même si ta réussite ne fait aucun doute ! Matthieu, bonne continuation dans l'équipe Bloom et surtout bon courage avec tes lignées primaires ! Pauline, merci pour ta gentillesse et tes explications lors de mon premier passage au laboratoire puis pour ton aide et ta disponibilité lorsque tu étais sur la plateforme d'imagerie. Sébastien, merci beaucoup de m'avoir encadré lors de mon arrivée au laboratoire et de m'avoir aussi bien initié à la détection des UFBs ! Enfin, un petit mot pour Olivier, merci d'avoir toujours répondu à mes questions avec autant de précisions et toujours une touche d'humour.

Je tiens également à remercier l'ensemble de l'institut Curie et en particulier les membres des services généraux et de la laverie du site d'Orsay ainsi que les membres de l'UMR3348. Merci à Pierre-Marie d'avoir pris le temps de répondre à mes incessantes « petites questions ». Nos conversations ont toujours été enrichissantes pour moi. Merci à Rym pour tes conseils en matière d'immunoprécipitation et ton sourire. Merci à Martin pour s'être toujours intéressé à l'avancée de mon article lorsqu'on se croisait à la machine à café. Et pour l'équipe Lambert...désolé d'avoir autant monopolisé le microscope 3D ! Je remercie également l'équipe de l'imagerie : Fabrice, Marie-Noëlle et Marine. Enfin, merci à Odile et Pascale pour leur soutien dans les méandres de l'administration et surtout pour leur bonne humeur communicative.

Je tiens aussi à remercier les personnes avec qui j'ai collaboré durant cette thèse : Julien Dairou, Massimo Lopes, Akshay Ahuja, Sara Chiker, Janet Hall, Sagar Sengupta, Florence Mahuteau-Betzer, Romain Najman, Claire Beauvineau, Damarys Loew, Vanessa Masson et Carine van Heijenoort.

Bien sûr je ne serais pas arrivé au bout de ma thèse sans l'aide et le soutien de mes amis. Merci à toi Mélanie, ma compagne d'aventure depuis la fac, embarquée avec moi dans la galère d'une thèse. Merci pour nos sorties (ah la convention Curie et sa fontaine de chocolat !) et nos discussions autour d'un « petit café ». Hélène, un océan nous sépare, mais ton amitié et tes mails réguliers ont été pour moi un soutien lors de ma thèse. Je remercie également Florine de m'avoir fait découvrir autant de petits restos parisiens ou nous nous sommes toujours régalés. Bon courage pour la fin de ta thèse et n'oublie pas d'ouvrir ton blog ! Flora, j'espère que tu t'épanouis à ton nouveau poste. Je n'oublierai pas nos longues discussions à côté de la cafetière puis nos déjeuners avec Géraldine. Et enfin, merci à tous les autres qui m'ont soutenu : Julien et Julien, Lydie, Romain, David, Céline et Manu.

Un grand merci à toi Jérémy, sans ton aide je n'aurais jamais eu le courage de me lancer dans cette aventure. Merci d'être à mes côtés depuis toutes ces années, merci de m'avoir supporté lorsque les manips ne marchaient pas, tu as fait preuve de beaucoup de patience...j'espère qu'il t'en reste un peu car le post-doc arrive ! Merci à mes parents et à ma sœur pour leur aide tout au long de mes études, sans vous et votre soutien indéfectible, jamais je ne serais allé aussi loin. Je remercie aussi mes beaux-parents ainsi que ma famille qui ont toujours pris des nouvelles de mes travaux, avec une pensée particulière pour toi Alain, même si tu n'es pas présent aujourd'hui, je sais à quel point tu aurais voulu être là.

Listes des figures, tableaux et abréviations

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

INTRODUCTION	p.21
Figure 1 : Représentation schématique de certains membres de la famille RecQ	p.25
Figure 2 : Implication des hélicases RecQ dans le métabolisme de l'ADN	p.27
Figure 3 : Rôles des hélicases RecQ pendant la réplication	p.28
Figure 4 : Rôles des hélicases RecQ pendant la recombinaison homologe (RH)	p.30
Tableau 1 : Liste regroupant les différents syndromes associés à la perte de fonctionnalité des hélicases RecQ	p.33
Tableau 2 : Liste des cent premiers cancers développés par 71 des 168 patients du registre de Bloom	p.36
Figure 5 : Exemple d'étalement chromosomique de cellules exprimant BLM (à gauche) ou de cellules n'exprimant pas BLM / cellules BS (à droite)	p.37
Figure 6 : Exemples d'anomalies mitotiques retrouvées sur des biopsies de peau de patients BS	p.39
Figure 7 : Exemples de ponts anaphasiques conventionnels (ou ponts chromatinien)	p.40
Figure 8 : Exemples d'UFBs en anaphase dans des cellules BS	p.41
Figure 9 : Modèle de la structure des UFBs	p.41
Figure 10 : Les substrats de l'hélicase BLM	p.44
Figure 11 : Modèle de la régulation de l'expression de BLM au cours du cycle cellulaire	p.45
Figure 12 : Exemples de certains partenaires de la protéine BLM	p.50
Figure 13 : Structures secondaires de l'ADN pouvant bloquer la progression des fourches de réplication	p.52
Figure 14 : Modèle de redémarrage par BLM d'une fourche de réplication bloquée	p.53
Figure 15 : Rôle de BLM dans la réparation des CDBs par la voie de la RH	p.54
Figure 16 : Restauration d'une fourche de réplication après cassure double-brins par la voie de réparation BIR	p.56
Figure 17 : Modèle des fonctions de BLM dans la prise en charge des CDBs par les systèmes de réparation	p.57
Figure 18 : Modèle de la fonction mitotique de BLM	p.60
Figure 19 : Modèle de la décaténation des centromères par le couple PICH/BLM	p.61
Tableau 3 : Listes des gènes dont l'expression est dérégulée en l'absence d'une protéine BLM fonctionnelle	p.65
Figure 20 : Structure chimique des bases azotées et des nucléosides associées	p.69

Figure 21 : Structure d'un nucléotide	p.70
Figure 22 : Schéma de la voie de synthèse de novo des nucléotides	p.72
Tableau 4 : Caractéristiques des transporteurs de nucléosides ENTs et CNTs	p.74
Figure 23 : Mode de régulation de la RNR au cours du cycle cellulaire ou après dommages de l'ADN	p.79
Figure 24 : Implication de la RNR et de TMPK dans la réponse aux CDBs	p.82
Figure 25 : Structure chimique des nucléosides et des principaux analogues de nucléosides	p.84
Figure 26 : Mécanismes d'action des analogues de nucléosides	p.85
Tableau 5 : Analogues de nucléosides utilisés dans le traitement de cancers	p.87
Figure 27 : Schéma récapitulant les sources et les conséquences d'un déséquilibre du pool de nucléotides	p.96
Tableau 6 : Liste des symptômes associés aux désordres innés des P&P	p.97
Figure 28 : Structure 3D d'un homotétramère de la CDA humaine	p.99
Tableau 7 : Paramètres cinétiques de substrats et inhibiteurs de la CDA	p.100
Figure 29 : Structure chimique de la cytidine et des ANs métabolisés par la CDA	p.104
Figure 30 : Schéma des conséquences de l'absence d'une protéine BLM fonctionnelle dans le phénotype BS	p.107
Figure 31 : Représentation des différents domaines des PARPs	p.112
Tableau 8 : Phénotypes associés aux modèles murins déplétés pour Parp-1 à Parp-3	p.113
Tableau 9 : Liste des fonctions des PARPs et de leurs localisations	p.118
Figure 32 : Métabolisme des PARPs	p.119
Figure 33 : Mécanisme d'élongation du poly-ADP-ribose	p.120
Figure 34 : Mécanisme de glycohydrolyse du poly-ADP-ribose	p.122
Figure 35 : Modèle de dégradation séquentielle du PAR	p.123
Figure 36 : Caractéristiques des domaines de reconnaissance du PAR	p.124
Figure 37 : Structure et organisation fonctionnelle de PARP-1	p.126
Figure 38 : Protéines impliquées dans le métabolisme de l'ADN et PARylées par PARP-1	p.128
Figure 39 : Modélisations du complexe PARP-1/ADN	p.129
Figure 40 : Modifications post-traductionnelles covalentes de PARP-1	p.131
Figure 41 : Mécanismes de régulation du pool de NAD ⁺ par PARP-1	p.133
Figure 42 : Représentation simplifiée de la voie de biosynthèse du NAD ⁺	p.134
Figure 43 : Implication de PARP-1 dans différentes voies de réparation de l'ADN	p.136
Figure 44 : Modèle présentant les fonctions de PARP-1 dans les mécanismes de	

réparation de l'ADN	p.141
Figure 45 : Implication de PARP-1 dans la réorganisation de la chromatine aux sites de cassures de l'ADN	p.144
Figure 46 : Fonctions de PARP-1 influençant la cancérogénèse	p.145
Figure 47 : PARP-1 régule l'activation de la voie de signalisation NF- κ B	p.147
Figure 48 : Fonctions de PARP-1 à l'interface de différents mécanismes de mort cellulaire	p.149
Figure 49 : Modèle d'activation de Chk1 à la fourche dépendant de PAR	p.152
Figure 50 : Mécanismes de régulation du cycle cellulaire par PARP-1	p.153
Figure 51 : Fonctions de PARP-1 dans la régulation de la transcription	p.156
Tableau 10 : Noms et structure chimique de certains inhibiteurs de PARP-1	p.159
PRESENTATION DU PROJET DE RECHERCHE	p.161
Figure 52 : Modèles de formation des ponts chromatiniens	p.165
Figure 53 : Origine et structure potentielles des trois types d'UFBs	p.171
RESULTATS	p.175
Figure 54 : Modèle de la formation d'UFBs surnuméraires en absence de la CDA	p.185
Figure 55 : La déplétion de la CDA compromet l'activation de Chk1 et l'activité de PARP-1 en réponse à un stress génotoxique	p.223
Figure 56 : La stabilisation de Chk1 sur la chromatine est dépendante de l'expression de la CDA	p.224
Figure 57 : Les cellules déficientes en CDA/PARP-1 continuent la synthèse d'ADN malgré un stress	p.226
Figure 58 : Les cellules déficientes en CDA ou en PARP-1 s'accumulent moins en phase S en réponse à un stress génotoxique	p.227
Figure 59 : Les cellules déficientes en CDA présentent un point de contrôle G2-M affaibli	p.228
Figure 60 : L'inhibition des points de contrôle régulés par Chk1 favorise la formation d'UFBs	p.230
Figure 61 : Implication de PARP-1 et de Chk1 dans la formation d'UFBs surnuméraires en absence de la CDA	p.231
Figure S1 : L'arrêt des cellules exprimant ou non la CDA en phase S après un stress génotoxique est dépendant de l'activité de CHk1 et d'ATR	p.232
Figure S2 : Les activités de Chk1 et d'ATR sont nécessaires pour prévenir la formation d'UFBs surnuméraires par un traitement par 2pM de CPT	p.233
Figure 62 : Phénotypes observés en prométaphase après déplétion de la cohésine	p.238
Figure 63 : La réexpression de la CDA dans des cellules BS réduit le pourcentage de cellules prométaphasiques présentant des disjonctions incomplètes des chromatides sœurs	p.239
Figure 64 : La déplétion de PICH dans des cellules exprimant la CDA induit une	

augmentation de la fréquence des cellules présentant des disjonctions incomplètes	p.240
Figure 65 : La réactivation de PARP-1 prévient l'augmentation de la fréquence de cellules prométaphasiques présentant des disjonctions incomplètes dans des cellules déplétées en CDA	p.241
Figure 66 : La déplétion de PARP-1 entraîne une augmentation du pourcentage de cellules présentant des disjonctions incomplètes	p.243
Figure 67 : L'inhibition de Chk1 promeut la disjonction incomplète des chromatides	p.244
Figure 68 : Modèle expliquant les disjonctions incomplètes observées après déplétion en CDA	p.245
Figure 69 : Exemples de cellules mitotiques présentant des UFBs	p.249
Figure 70 : Cinétique de résolution des UFBs au cours de la mitose	p.250
Figure 71 : Recrutement de PICH, BLM et RPA sur les UFBs	p.251
Figure 72 : BLM et résolution des UFBs	p.252
DISCUSSION	p.253
Figure 73 : Comparaison de la structure chimique du NAD ⁺ , de la dCTP, de la dTTP et de la Gemcitabine	p.257
Figure 74 : Implications respectives de la déficience en CDA ou en BLM dans différentes composantes du phénotype Bloom.	p.260
Figure 75 : Modèle de prise en charge de l'excès d'ADN non répliqué avant l'anaphase	p.263
Figure 76 : Modèle de formation des UFBs en réponse à une activation amoindrie de Chk1	p.266
Figure 77 : Mécanisme d'action du « point de contrôle mitotique d'ADN non répliqué »	p.268

LISTE DES ABREVIATIONS

2-CdA : Cladribine	BRCA : breast cancer type 1 susceptibility	E. Coli : Escherichia Coli
53BP1 : p53-binding protein 1	BRCT : BRCA1 C-terminus	EdU : 5-ethynyl-2'-deoxyuridine
5fdC : 5-formyl-2'-désoxycytidine	BrdU : 5-bromodésoxyuridine	ENT : Equilibrative nucleoside transporters
5hmdC : 5-hydroxyméthyle-2'-désoxycytidine	BS : Syndrome de Bloom	ERK1/2 : extracellular signal-regulated kinase 1/2
5mdC : 5-méthyle-2'-désoxycytidine	CAD : Dihydroorotase trifunctional enzyme	FA : Anémie de Fanconi
ADN : Acide désoxyribonucléiques	CDA : Cytidine désaminase	FEN1 : flap endonuclease 1
ADNdb : ADN double brin	CDB : Cassure double brins	FISH : Fluorescence in situ hybridization
ADNsb : ADN simple brin	Cdc25A : cell division cycle 25A	FS-UFB : UFB associé aux sites fragiles
AHR : aryl hydrocarbon receptor	Cdk : Cyclin-dependent kinase	FZEB : 5-fluorozebularine
AID : Activation-induced cytidine deaminase	CENPA : kinetochore protein centromere A	GART : Phosphoribosylglycinamide Formyltransferase
AIF : apoptosis inducing factor	CENPB : kinetochore protein centromere B	GFP : green fluorescent protein
ALC1 : Amplified in Liver Cancer 1	CFS : common fragile site	H ₂ O ₂ : Peroxyde d'hydrogène
AML : Leucémies aigües myéloïdes	ChIP : Immunoprécipitation de la chromatine	HP-1 α : heterochromatin protein
AMPK : AMP-activated protein kinase	Chk1 : Checkpoint kinase 1	HPV : Human papilloma virus
AN : Analogues de nucléosides	CHO : Chinese Hamster Ovary	HDAC : histone acétyl déacétylase
APC : Anaphase-promoting complex	CNT : Concentrative nucleoside transporters	HIF : hypoxia inducible factorHRDC : hélicase/RNase D C-terminale
APH : Aphidicoline	CPB : CREB-binding protein	HU : Hydroxyurée
APLF : aprataxin and PNK-like factor	CPSII : Carbamoyl phosphate synthase II	IL-4 : interleukin 4
AraC : Cytidine arabinoside	CPT : Camptothécine	IMP : Inosine mono-phosphate
ARH3 : ADP-ribosyl-acceptor hydrolase-3	CSB : Cassure simple brin	JH : Jonction de Holliday
ARN : Acide ribonucléiques	CSR : class switch recombination	JNK1 : c-jun N-terminal kinase 1
AT : l'Ataxie Téléangiectasie	C-UFB : UFB centromérique	MCB : MluI cell cycle box
ATCase : Aspartate transcarbamoylase	DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole	MIB1 : mindbomb E3 ubiquitin protein ligase 1
ATM : Ataxia-telangiectasia mutated protein kinase	DC : domaine catalytique	MNM : nicotinamide mononucléotide
ATR : Ataxia-telangiectasia- and RAD3-related protein kinase	Dcd : dCTP désaminase	MRE11 : meiotic recombination 11
Aza-dC : Aza-désoxy-cytidine	dCK : Deoxycytidine kinase	MTHFD1 : Méthylentetrahydrofolate Dehydrogenase 1
BER : réparation par excision de base	dGK : Deoxyguanosine kinase	NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide
BGS : Syndrome de Baller-Gerold	dJH : Double jonction de Holliday	NADS : NAD synthase
BIR : Break Induced Replication	DNMT1 : DNA methylation by dimerization with	NAM : nicotinamide
BLAP : BLM-associated polypeptides	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1	
BLMr : BLM recombinante	dNTPs : Désoxynucléotides 5'triphosphates	

NaMN : acide nicotinique mononucléotide
 NAMPT : nicotinamide phosphorybosyltransferase
 Ndk : diphosphate kinase
 NDP : Nucléotide diphosphate
 NF-κB : nuclear factor κB
 NHEJ : Non homologous end joining
 NLS : Séquence de localisation nucléaire
 NMD : Nonsense-mediated mRNA Decay
 NMNATs : MNM adenytransferase
 NMP : Nucléotide monophosphate
 NOS : nitric oxide synthase
 NTP : Nucléotides triphosphates
 NTP : Nucléotide triphosphate
 NUMA : nuclear mitotic apparatus protein
 NuRD : nucleosome remodeling deacetylase
 O₂⁻ : Anion superoxyde
 PAR : Poly-ADP-ribose
 PARG : poly(ADP-ribose) glycohydrolase
 PARP-1 : Poly-ADP-ribose polymérase 1
 PARylation : Poly-ADP-ribosylation
 PBM : PAR-binding motif
 PbR : PAR-binding region
 PBZ : PAR-binding zinc finger
 PCNA : Proliferating-Cell Nuclear Antigen
 PECAM1/CD31 : platelet/endothelial cell adhesion molecule
 PICH : Plk1 interaction checkpoint helicase
 Plk1 : Polo-like kinase 1
 PML : Promyeloctic Leukemia Protein
 PNKP : polynucleotide kinase 3'-phosphatase
 PNP : Polynucléotide phosphorylase
 POT1 : Protection of telomere 1
 PPAT : Phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase
 PRC : protein complex
 PRPP : Ribose-5-phosphoribosepyrophosphate
 ReH : région hélicoidale

RH : Recombinaison homologue
 RMI : RecQ-mediated genome instability
 RNR : Ribonucléotide diphosphates
 ROS : Espèces réactives de l'oxygène
 RPA : Replication protein A
 RQC : RecQ carboxy-terminal
 RTS : Syndrome de Rothmund-Thompson
 Scc1 : sister chromatid cohesion 1
 SCE : Sister-chromatid exchange
 SDC-4 : transmembrane signaling protein syndecan-4
 shRNA : short-hairpin RNA
 SLC : Solute carrier
 SmarCA4 : ATP-dependent helicase Brg1
 SNP : Single nucleotide polymorphisms
 SSBR : single-strand break repair
 SUMO : Small ubiquitine-like modifier
 SV40 : Simian virus 40
 TDP1 : tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1
 THU : Tétrahydrouridine
 TIF-1β : transcriptional intermediary factor
 TK : Thymidine kinase
 TMPK : Thymidylate kinase
 TopBP1 : Topoisomerase-IIβ-binding protein 1
 Topo IIIα : Topoisomérase IIIα
 Topo IIα : Topoisomérase IIα
 TRF : Telomeric repeat factor
 TS : thymidilate synthétase
 T-UFB : UFB télomérique
 UFBs : Ponts anaphasiques ultrafins
 UMPS : UMP synthase
 UV : Ultra-violet
 VEEV : Venezuelan equine encephalitis virus
 VEGF : vascular endothelial growth factor
 XP : Xeroderma Pigmentosum
 XRCC1 : X-ray repair cross-complementing protein 1



Lors de la division cellulaire, la duplication complète et la séparation correcte du génome sont nécessaires afin d'assurer une transmission fidèle de l'information génétique aux cellules filles. Les erreurs pouvant intervenir au cours de la réplication sont particulièrement délétères car elles peuvent influencer à la fois sur la duplication du génome, son intégrité et sur sa ségrégation (pour revues : Gelot *et al.*, 2015 ; Magdalou *et al.*, 2014). Afin de prévenir ces anomalies, des mécanismes finement régulés sont activés en réponse aux dommages de l'ADN, à des stress de réplication ou à des anomalies mitotiques afin de préserver la stabilité du génome.

La mutation de gènes impliqués dans le maintien de l'intégrité du génome conduit à des syndromes prédisposant au développement de cancers (pour revue: Knoch *et al.*, 2012). Le syndrome de Bloom (BS) illustre cette corrélation entre instabilité génétique et cancérogenèse. Il s'agit d'une maladie génétique autosomique récessive rare associant une forte instabilité génétique et une prédisposition au développement de tous les types de cancers affectant la population générale. Cette pathologie est due à la mutation des deux copies du gène *BLM* codant pour une hélicase du même nom (pour revue : Chu et Hickson, 2009). Ce syndrome est très étudié dans notre laboratoire pour identifier et caractériser de nouveaux mécanismes pouvant affecter la stabilité du génome et favoriser ainsi les processus de cancérogenèse.

Les cellules BS présentent de nombreuses anomalies dont un stress de réplication constitutif dû à un ralentissement de la vitesse de progression des fourches de réplication (Rao *et al.*, 2007). Une étude réalisée au laboratoire peu avant mon arrivée a montré que ce ralentissement est provoqué par la diminution drastique de l'expression de la cytidine désaminase (CDA), une enzyme de la voie de synthèse des pyrimidines. La forte diminution de son expression conduit à un déséquilibre du pool de pyrimidines qui est à l'origine de certains aspects du phénotype Bloom, et en particulier du ralentissement de la vitesse de progression des fourches de réplication (Chabosseau *et al.*, 2011).

Les cellules BS présentent également des anomalies mitotiques, notamment une augmentation de la fréquence des ponts anaphasiques (Chan *et al.*, 2007). Ces ponts sont des structures d'ADN reliant deux pôles d'une cellule au cours de la mitose. Bien que leurs origines moléculaires ne soient pas encore clairement définies, ils sont considérés comme des marqueurs d'instabilité génétique (pour revue : Chan et Hickson, 2009). Etant donné qu'un stress de réplication peut conduire à des anomalies en mitose, mon projet de recherche avait pour but de déterminer si la déficience en CDA pouvait être à l'origine de l'augmentation de la fréquence des ponts anaphasiques observée dans les cellules BS.

INTRODUCTION

L'introduction de ce manuscrit sera développée selon trois axes :

La première section sera dédiée à la famille des hélicases RecQ et aux syndromes associés à leur déficience. Le syndrome de Bloom et l'hélicase BLM seront plus particulièrement détaillés.

La deuxième section permettra d'introduire le pool de nucléotides ainsi que les conséquences connues d'un déséquilibre de ce pool. Les activités et fonctions de la cytidine désaminase (CDA), enzyme de la voie de synthèse des pyrimidines, seront approfondies.

Enfin, mes travaux de thèse ont montré que l'activité de la protéine PARP-1 est altérée dans les cellules déficientes en CDA, qu'elles expriment ou non l'hélicase BLM. La dernière section de cette introduction sera donc centrée sur la famille des protéines PARPs et en particulier sur PARP-1, une enzyme multifonctionnelle.

1

Les hélicases RecQ et syndromes associés à leur déficience

De nombreux processus biologiques (réparation, réplication, transcription...) nécessitent la séparation des deux brins de l'ADN afin de rendre accessible aux protéines l'information génétique. Cette réaction de séparation de l'ADN double brin (ADNdb) en ADN simple brin (ADNsb) est catalysée par des moteurs moléculaires spécialisés appelées hélicases (van Brabant *et al.*, 2000). La famille des RecQ, nommée ainsi par homologie avec la protéine RecQ d'*Escherichia Coli* (*E. Coli*) découverte à l'université de Kyushu au Japon (d'où son nom), fait partie des groupes d'hélicases les plus étudiés actuellement (pour revues : Chu et Hickson, 2009 ; Croteau *et al.*, 2014). Cette famille de protéines ainsi que les syndromes associés à leur déficience seront traités dans ce premier chapitre.

1. La famille des hélicases RecQ

Cette famille d'hélicases est très bien conservée des organismes procaryotes à eucaryotes. Les organismes unicellulaires (à l'exception de *Schizosaccharomyces pombe*) présentent généralement une seule hélicase de type RecQ, alors que les organismes pluricellulaires possèdent au moins deux membres de cette famille (Chu et Hickson, 2009). Elles sont caractérisées biochimiquement par leur activité d'hélicase à ADN de polarité 3'-5' dépendante de l'ATP et du Mg^{2+} (Umezumi *et al.*, 1990).

Les hélicases RecQ les plus étudiées sont les cinq membres présents chez l'homme, à savoir RecQ1, BLM, WRN, RecQ4 et RecQ5, ainsi que les hélicases Sgs1 et Rqh1, présentes respectivement chez *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe*.

1.1 Domaines

L'architecture des hélicases RecQ (pour revue : Kitano *et al.*, 2014) se compose de différents domaines fonctionnels conservés permettant de classer ces hélicases en deux groupes, en fonction de leur taille et de la présence ou non de domaines N- ou C-terminaux. Ainsi, le premier groupe de bas poids moléculaires contient les protéines RecQ1 et RecQ5, dont les tailles varient entre 649 et 991 acides aminés et le second groupe de haut poids moléculaires est constitué des protéines WRN, BLM, RecQ4, Sgs1 et Rqh1, dont les tailles varient entre 1208 et 1447 acides aminés.

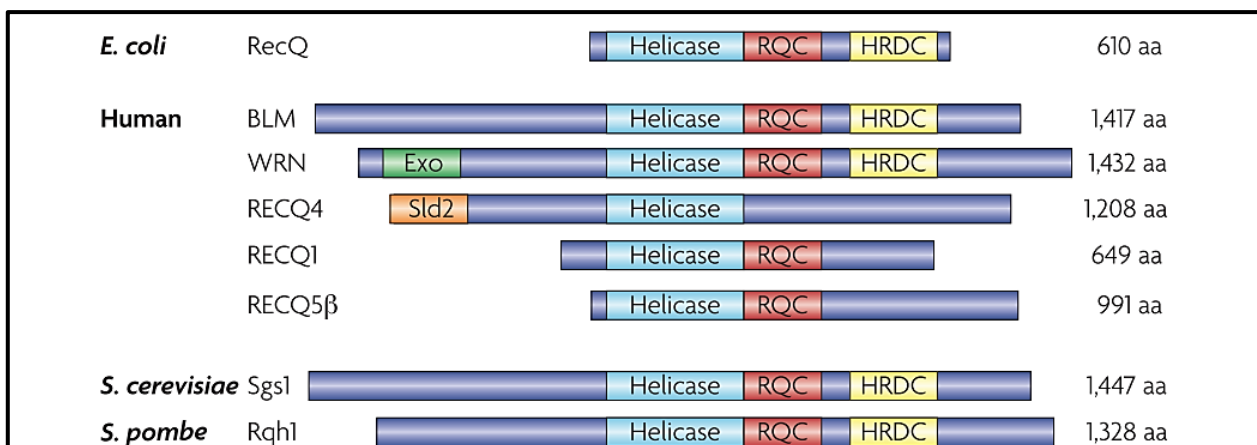


Figure 1 : Représentation schématique de certains membres de la famille RecQ.

Les différents organismes auxquels appartiennent les hélicases sont indiqués à gauche suivis du nom de chaque protéine. Le nombre d'acides aminés est indiqué à droite. Les principaux domaines conservés chez les hélicases RecQ : domaine hélicase, domaine RQC et HRDC sont indiqués respectivement en bleu ciel, rouge et jaune. Le domaine exonucléase de WRN et le domaine Sld2-like de RecQ4 sont représentés respectivement en vert et orange. Les régions colorées en bleu marine correspondent à des régions faiblement conservées entre les différentes protéines (d'après Chu et Hickson, 2009).

Certains domaines définissent des membres spécifiques de la famille RecQ et pourraient être importants pour la spécificité de chaque hélicase, tels que le domaine exonucléase de WRN (Chu et Hickson, 2009). A l'inverse, d'autres sont communs à la majorité des membres de cette famille de protéines. Ainsi, trois principaux domaines conservés des procaryotes aux eucaryotes, sont caractéristiques des hélicases RecQ : le domaine hélicase, le domaine RecQ carboxy-terminal (RQC) et le domaine hélicase/RNase D C-terminale (HRDC) (Figure 1).

1.1.1 Le domaine hélicase :

Le domaine hélicase est essentiel pour la fixation de l'ATP et son hydrolyse (Vindigni *et al.*, 2010 ; Swan *et al.*, 2014) et caractérise les hélicases de type RecQ. Il s'agit du domaine le plus conservé de la famille (Kitano, 2007), il consiste en une série de huit motifs spécifiques d'acides aminés : 0, I, Ia, II, III, IV, V et VI (Bernstein et Keck 2003 ; Gorbalenya *et al.*, 1989). Les motifs I et II vont être particulièrement importants pour ce domaine. En effet, le motif I contient une série d'acides aminés GxGKS/T qui va interagir avec le carbone 6 du sucre et les phosphates des cofacteurs nucléotidiques. Le motif II contient quant à lui un résidu aspartate hautement conservé qui lie l'ion Mg^{2+} et un résidu glutamine, tous deux nécessaires à la réaction de dégradation de l'ATP par l'enzyme (Gorbalenya *et al.*, 1989). Il est important de noter que l'appellation « hélicase » attribuée à ce domaine porte à confusion car il n'a pas à proprement parlé d'activité hélicase (Von Kobbe *et al.*, 2003 ; Lee *et al.*, 2005 ; Janscack *et al.*, 2003). En effet, cette fonction est assurée par le domaine RQC : ensemble ils forment le « noyau hélicase » et sont nécessaires à l'activité de désappariement de brins des protéines RecQ (Kitano, 2014).

1.1.2 Le domaine RQC

Le domaine RQC contient le site de liaison à l'ADN et l'activité de catalyse du duplex d'ADN (Kitano *et al.*, 2010 ; Swan *et al.*, 2014). Il peut être séparé en deux sous-domaines : l'un correspondant à une plateforme d'interaction par le zinc et l'autre correspondant à une structure hélice-boucle-hélice très conservée. Ces deux sous-domaines vont former une structure spécifique adoptant la forme d'un large sillon à la surface de la protéine, correspondant probablement au site de liaison à l'ADNdb (Bernstein *et al.*, 2003).

De plus, ce domaine remplit une fonction plus large que la seule activité hélicase. Effectivement, il pourrait être important dans le maintien de l'intégrité structurale et la stabilité des hélicases RecQ (Guo *et al.*, 2005 ; Liu *et al.*, 2004) et dans l'interaction avec des partenaires (Vindigni et Hickson, 2009). Il pourrait également apporter une spécificité à ces protéines, notamment via une séquence

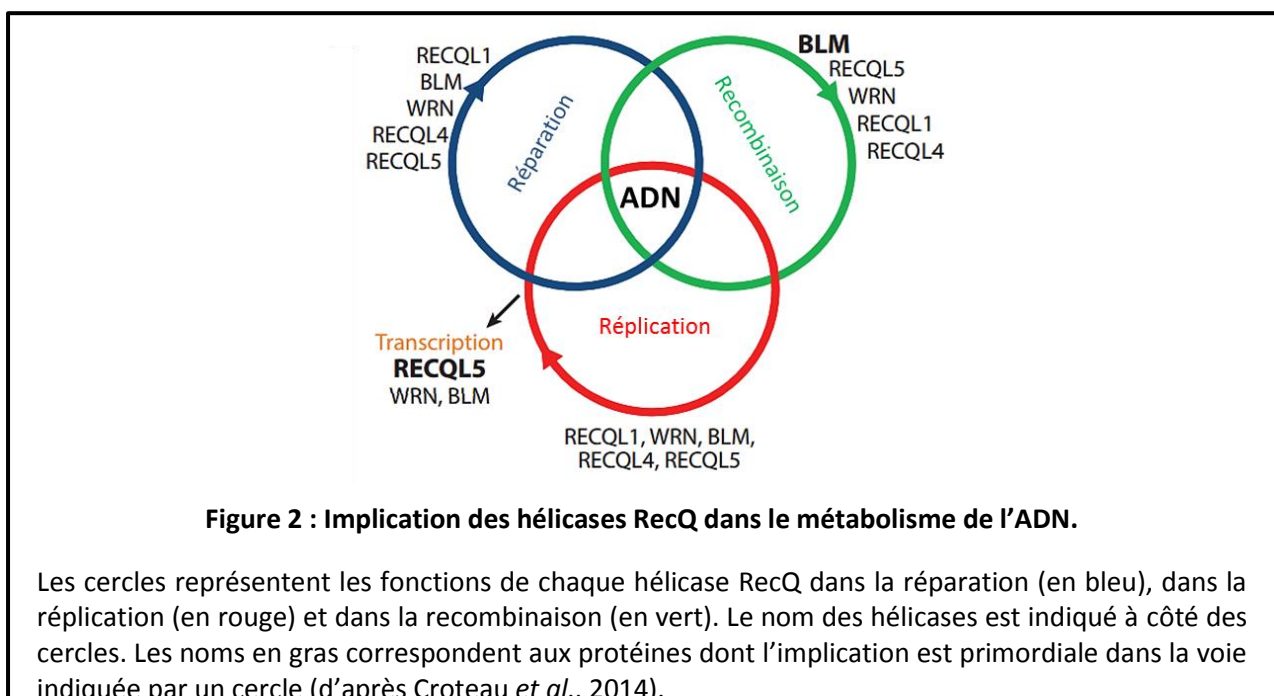
présentant une forte affinité pour certains substrats (Huber *et al.*, 2006). Enfin, ce domaine pourrait prévenir des interactions non spécifiques avec l'ADN (Kitano, 2014).

1.1.3 Le domaine HRDC

Défini par analogie avec le domaine C-terminal de la RNase D (Morozov *et al.*, 1997), le domaine HRDC est le domaine le moins conservé des hélicases RecQ humaines. Chez l'homme, ce domaine n'est effectivement retrouvé que dans les protéines BLM et WRN dans lesquelles il pourrait avoir un rôle auxiliaire dans l'interaction avec l'ADN (Kitano *et al.*, 2014). Son absence de certaines hélicases RecQ suggère qu'il n'est pas strictement nécessaire à la processivité le long de l'ADN mais qu'il pourrait plutôt apporter une spécificité de substrat (Vindigni et Hickson, 2009). De plus, ce domaine pourrait participer à l'interaction de WRN avec certaines protéines recrutées aux sites de dommages de l'ADN, promouvant indirectement son recrutement aux sites de cassures doubles brins (CDBs) (Kitano et al, 2007). Enfin, ce domaine pourrait également participer à des changements de conformation de la protéine BLM (Newman *et al.*, 2015).

1.2 Fonctions cellulaires : les gardiennes du génome

Les hélicases RecQ sont considérées comme des gardiennes multifonctionnelles du génome (Chu et Hickson, 2009). En effet, elles jouent un rôle dans chaque aspect du métabolisme de l'ADN : réplication, réparation, recombinaison et transcription (Figure 2) (pour revue : Croteau *et al.*, 2014).



En facilitant ou en inhibant des étapes clés de ce métabolisme, les hélicases RecQ vont ainsi maintenir la stabilité du génome et donc prévenir l'accumulation d'anomalies favorisant le développement de cancers.

1.2.1 RecQ et réplication

La duplication du génome est primordiale afin de transmettre un matériel génétique intact à chaque cellule fille. Il s'agit d'un processus finement contrôlé afin de prévenir tout événement pouvant affecter le programme de réplication, menaçant ainsi la stabilité du génome. Parmi ces événements on retrouve les obstacles pouvant gêner la progression des fourches de réplication tels que des structures secondaires de l'ADN, des lésions de l'ADN, ou encore une collision de la fourche avec la machinerie de transcription (pour revues : Mazouzi *et al.*, 2014 ; Magdalou *et al.*, 2014).

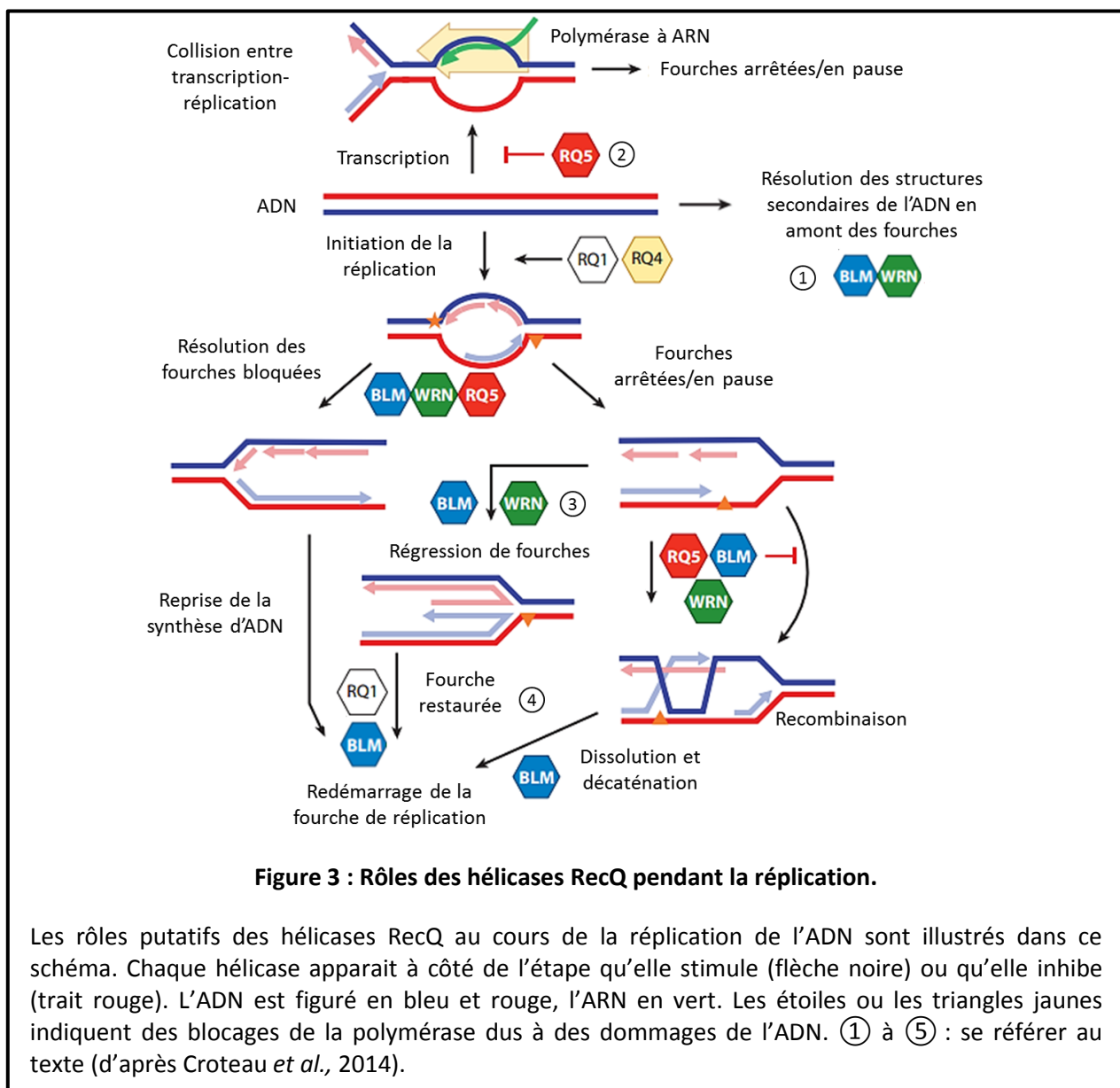


Figure 3 : Rôles des hélicases RecQ pendant la réplication.

Les rôles putatifs des hélicases RecQ au cours de la réplication de l'ADN sont illustrés dans ce schéma. Chaque hélicase apparaît à côté de l'étape qu'elle stimule (flèche noire) ou qu'elle inhibe (trait rouge). L'ADN est figuré en bleu et rouge, l'ARN en vert. Les étoiles ou les triangles jaunes indiquent des blocages de la polymérase dus à des dommages de l'ADN. ① à ⑤ : se référer au texte (d'après Croteau *et al.*, 2014).

La prévention de la collision d'une fourche avec un obstacle ainsi que les mécanismes permettant de répondre à cette collision constituent un enjeu majeur pour maintenir la stabilité génétique. En tant que gardiennes du génome, les hélicases RecQ vont faciliter la réplication en résolvant des structures d'ADN qui pourraient bloquer la progression de la machinerie de réplication. Par exemple, les G-quadruplexes ou les structures en épingles à cheveux, qui sont des substrats des hélicases RecQ, sont connus pour entraîner des arrêts des fourches de réplication (pour revue : León-Ortiz *et al.*, 2014). Ainsi, BLM et WRN pourraient résoudre ces structures en amont de la fourche de réplication facilitant par conséquent sa progression sans encombres (① de la figure 3) (Sidorova *et al.*, 2013 ; Sidorova *et al.*, 2008 ; pour revue : Hickson, 2003). La machinerie de transcription constitue également un obstacle pour la fourche de réplication (pour revue : Magdalou *et al.*, 2014). Ainsi, il a été proposé que l'hélicase RecQ5 pourrait inhiber la transcription en interagissant et en régulant la polymérase à ARN II (Pol II), prévenant ainsi les collisions entre machineries de réplication et de transcription (② de la figure 3) (Islam *et al.*, 2010 ; Kanagaraj *et al.*, 2010 ; Li *et al.*, 2015 ; pour revue : Popuri *et al.*, 2013).

Lorsqu'une fourche de réplication rencontre néanmoins un obstacle, il est nécessaire de la stabiliser afin d'éviter son effondrement, puis de favoriser son redémarrage lorsque l'obstacle est éliminé par résolution de la structure/lésion correspondante. Les hélicases RecQ participent à la fois à l'étape de stabilisation et à l'étape de redémarrage des fourches. En effet, *in vitro*, les hélicases BLM et WRN peuvent catalyser la régression de structures mimant des fourches de réplication présentant une conformation en « *chicken foot* » de type « *jonction de Holliday* » (fourches régressées), induisant ainsi leur stabilisation (Ralf *et al.*, 2006 ; Machwe *et al.*, 2006). Il a donc été proposé que BLM et WRN pourraient favoriser, *in vivo*, la régression et donc la stabilisation des fourches de réplication ayant heurté un obstacle (③ de la figure 3). Ensuite, une fois l'obstacle éliminé, BLM et RecQ1 pourraient favoriser le redémarrage des fourches de réplication ayant régressé (④ de la figure 3) (Rao *et al.*, 2007 ; Berti *et al.*, 2013).

Les principales fonctions des hélicases RecQ dans la réplication reposent donc sur deux aspects complémentaires : résoudre des structures secondaires de l'ADN susceptibles de constituer des obstacles pouvant perturber le programme de réplication et favoriser la stabilisation/redémarrage de la fourche en cas d'arrêt (pour revue : Croteau *et al.*, 2014).

1.2.2 RecQ et recombinaison homologue

La recombinaison homologue (RH) est un processus essentiel participant au maintien de l'intégrité génomique. Il s'agit d'un mécanisme permettant le redémarrage ou la restauration de

fourches de réplifications bloquées et la réparation des CDBs de l'ADN (pour revues : Aze *et al.*, 2013 ; Guirouilh-Barbat *et al.*, 2014). C'est également un processus qui peut être délétère du fait de la présence de séquences répétées dans les cellules de mammifères. En effet, les événements de RH peuvent conduire à des « *crossing-overs* » induisant des réarrangements chromosomiques dont des délétions, des inversions et des translocations, ou bien produire des intermédiaires de recombinaison létaux (Kolodner *et al.*, 2002 ; Weinstock *et al.*, 2006). Il est donc primordial que ces événements de RH soient finement régulés.

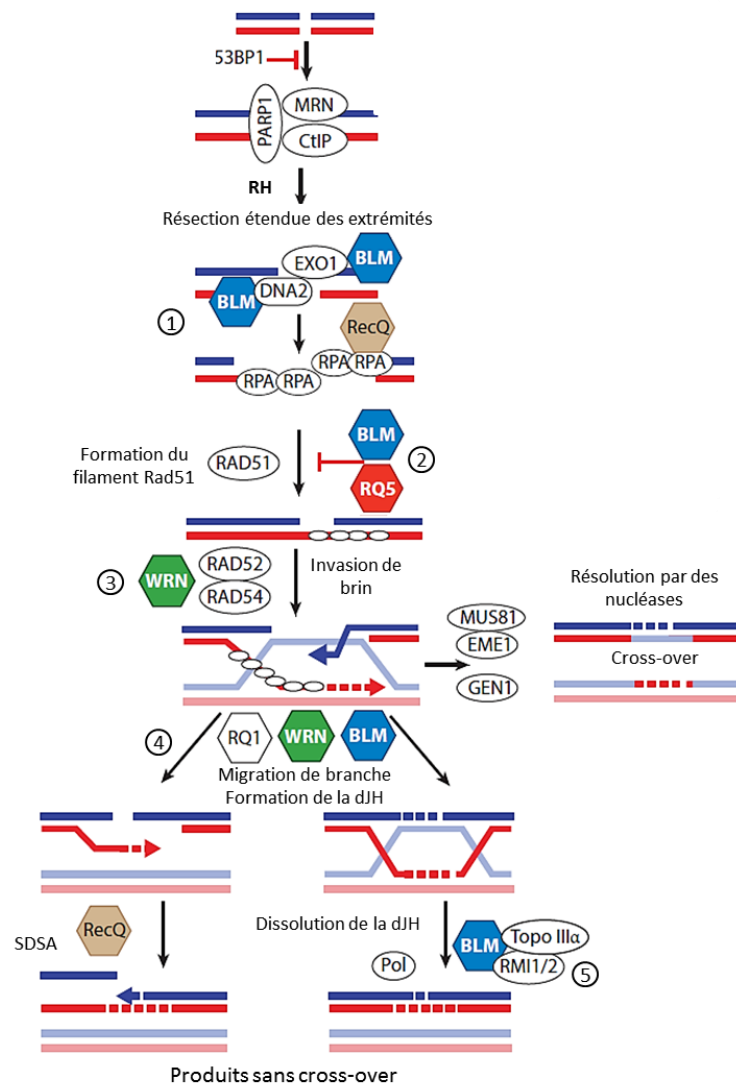


Figure 4 : Rôles des hélicases RecQ pendant la recombinaison homologue (RH).

Les rôles putatifs des hélicases RecQ au cours de la RH sont illustrés dans ce schéma. Chaque hélicase apparaît à côté de l'étape qu'elle stimule (flèche noire) ou inhibe (trait rouge). L'ADN est figuré en bleu et rouge. RH : recombinaison homologue ; SDSA : « *synthesis-dependent strand annealing* ». ① à ⑤ : se référer au texte (adapté de Croteau *et al.*, 2014).

Les hélicases RecQ possèdent des activités pro ou anti-recombinogènes en fonction du contexte, permettant de prévenir l'accumulation d'intermédiaires de RH délétères pour la cellule. Par exemple, via son interaction avec les protéines DNA2 et EXO1, BLM va favoriser la résection des extrémités des CDBs lors des étapes précoces de la RH (① de la figure 4) (Aggarwal *et al.*, 2010 ; Nimonkar *et al.*, 2008 ; Doherty *et al.*, 2005 ; Nimonkar *et al.*, 2011). De plus, BLM et RecQ5 pourraient, par une activité translocase, inhiber la RH en promouvant la dissociation du nucléofilament RAD51, nécessaire à la recherche d'homologie et à la formation de la D-loop (② de la figure 4) (Hu *et al.*, 2007 ; Wu *et al.*, 2001 ; Bugreev *et al.*, 2007 ; Schwendener *et al.*, 2010), alors que WRN pourrait favoriser l'invasion de brin via son interaction avec les protéines RAD52 et RAD54 (③ de la figure 4) (Baynton *et al.*, 2003 ; Otterlei *et al.*, 2006). Lors des étapes tardives de la RH, RecQ1, BLM et WRN vont également stimuler la migration de branches, à l'origine de la formation d'une double jonction de Holliday (dJH) (④ de la figure 4) (LeRoy *et al.*, 2005 ; Bugreev *et al.*, 2008 ; Opresko *et al.*, 2009 ; Karow *et al.*, 2000 ; Bachrati *et al.*, 2006). Enfin, BLM pourrait catalyser la dissolution de cette dJH sans échange de brins (⑤ de la figure 4), prévenant ainsi sa résolution par des nucléases conduisant à des CDBs et à des événements de RH avec ou sans « *crossing-over* » (Croteau *et al.*, 2014). *Cet aspect sera détaillé dans la section dédiée à BLM (section 3.6.3).*

Enfin, il est intéressant de noter que RPA, une protéine recrutée sur l'ADNsb afin de le protéger lors des étapes précoces de la RH, interagit et stimule l'activité hélicase de tous les membres de la famille des RecQ (Garcia *et al.*, 2004 ; Cui *et al.*, 2003 ; Brosh *et al.*, 1999 ; Rossi *et al.*, 2010 ; Sartori *et al.*, 2007).

Les protéines de la famille RecQ sont donc des acteurs clés de la régulation de la RH. A travers leur capacité à stimuler ou à inhiber certaines étapes de la RH, cette famille d'hélicases va prévenir la formation de « *crossing-over* » tout en stimulant la réparation des CDBs (pour revue Croteau *et al.*, 2014).

1.2.3 RecQ et point de contrôle de phase S

Le point de contrôle intra-S est activé pour maintenir la stabilité des fourches de réplication et promouvoir leur redémarrage. Les protéines ATR (« *ataxia-telangiectasia- and RAD3-related protein kinase* ») et ATM (« *ataxia-telangiectasi mutated protein kinase* ») jouent un rôle primordial et ont des fonctions spécifiques dans ce point de contrôle dont elles contrôlent l'activation (pour revue : Segurado et Tercero, 2009).

Les hélicases RecQ sont également impliquées dans ce mécanisme. Ainsi, les kinases ATM et ATR ne sont pas correctement activées après induction de dommages de l'ADN dans des cellules

déficientes pour l'hélicase WRN (Cheng *et al.*, 2008, Patro *et al.*, 2011), ce qui conduit à l'effondrement des fourches de réplication rencontrant une lésion et à des CDBs (Cheng *et al.*, 2008 ; pour revue : Pichierri *et al.*, 2011). Les cellules déficientes pour RecQ4 présentent également un défaut d'activation du point de contrôle de phase S après une exposition aux UV, à de l'hydroxyurée (HU) ou à des radiations ionisantes (Kohzaki *et al.*, 2012, Park *et al.*, 2006). Enfin, BLM est également importante pour la reprise après un arrêt en phase S suite à un traitement par de l'HU (Davies *et al.*, 2004). *Cette partie sera détaillée dans la section dédiée à BLM (section 3.6.1).*

L'ensemble de ces données souligne l'importance des hélicases RecQ dans le maintien de la stabilité du génome via la régulation d'étapes clés du métabolisme de l'ADN. Leur absence ou leur inactivation va favoriser l'accumulation d'événements délétères, promouvant la cancérogénèse. Ainsi, la déficience de trois des cinq hélicases RecQ humaines, conduit à des syndromes associant instabilité génétique et prédisposition aux cancers détaillés dans la section suivante (Chu et Hickson, 2009, Croteau *et al.*, 2014) (Tableau 1).

1.3 Syndromes associés à la déficience en hélicase RecQ

1.3.1 WRN et le syndrome de Werner

La mutation des deux copies du gène codant pour l'hélicase WRN, localisé en 8p12, conduit au syndrome de Werner (Gray *et al.*, 1997). Les mutations de ce gène sont principalement des mutations non-sens conduisant à une protéine tronquée affectant à la fois les fonctions hélicase et exonucléase de WRN, soulignant ainsi l'importance de ces deux fonctions dans le développement de ce syndrome (Huang *et al.*, 2006).

Le syndrome de Werner fait partie des maladies progéroides segmentaires caractérisées par un vieillissement prématuré affectant l'ensemble des organes. Les patients WRN grandissent de manière harmonieuse et présentent des fonctions cognitives normales durant l'enfance. Les premiers signes cliniques apparaissent plus tard, au moment de la puberté, et affectent l'ensemble des organes des patients qui présentent ainsi une espérance de vie proche de 50 ans (pour revue : Oshima et Hisama, 2014). En outre, ils sont prédisposés au développement de cancers mésoenchymateux ou de sarcomes (Chu et Hickson, 2009 ; Croteau *et al.*, 2014), ce qui représente, avec les problèmes cardiovasculaires, la principale cause de décès de ces patients (Goto *et al.*, 2013 ; Lauper *et al.*, 2013). Enfin, les patients WRN peuvent également présenter différentes pathologies telles qu'un diabète de type II, de l'ostéoporose ou une cataracte (Croteau *et al.*, 2014).

BLM	WRN	RecQ4		
Syndrome de Bloom	Syndrome de Werner	RTS	BGS	RAPADILINO
Prédisposition à tous les types de cancers	Prédisposition aux sarcomes et cancers méenchymateux	Prédisposition aux ostéosarcomes et aux lymphomes	Prédisposition aux lymphomes	Prédisposition aux ostéosarcomes
Petite taille, malformations squelettiques	Petite taille, membres minces	Petite taille, malformations squelettiques	Malformations squelettiques	Petite taille, malformations squelettiques
Anomalités de l'épiderme : rougeurs, vaisseaux sanguins dilatés	Anomalités de l'épiderme : perte de graisse, rides	Anomalités de l'épiderme : poikilodermie	Anomalités de l'épiderme : poikilodermie	Déformation du palais
Retard mental	Vieillessement prématuré/perte des cheveux	Cheveux clairsemés		Intelligence normale
Déficit immunitaire	Ostéoporose			Diarrhée
Diabète de type II	Diabète de type II			
Infertilité masculine et fertilité féminine réduite	Cataractes			
	Athérosclérose			

Tableau 1 : Liste regroupant les différents syndromes associés à la perte de fonctionnalité des hélicases RecQ (d'après Croteau *et al.*, 2014).

Au niveau cellulaire, l'absence d'une protéine WRN fonctionnelle induit une augmentation des translocations chromosomiques et des délétions (Ariyoshi *et al.*, 2007), un raccourcissement des télomères (Schulz *et al.*, 1996), une augmentation du stress oxydant et une prolifération cellulaire amoindrie (Seco-Cervera *et al.*, 2014), une augmentation des ponts anaphasiques ultrafins (UFBs) (Barefield et Karlseder, 2012), et enfin un ralentissement de la vitesse de progression des fourches de réplication (Sidorova *et al.*, 2008 ; Sidorova *et al.*, 2013).

1.3.2 RecQ4 et syndromes associés

La mutation des deux copies du gène codant pour l'hélicase RecQ4, localisé en 8q24.3, est associée à trois syndromes différents en fonction de la position de la mutation : le syndrome de Rothmund-Thompson (RTS) (Kitao *et al.*, 1999, pour revue : Larizza *et al.*, 2010), le RAPADILINO (Kääriäinen *et al.*, 1989 ; pour revue : Siitonen *et al.*, 2003) et le syndrome de Baller-Gerold (BGS) (Feingold *et al.*, 1979 ; pour revue : Van Maldergem *et al.*, 2006). Le RTS prédispose les patients au

développement d'ostéosarcomes et de lymphomes. A l'inverse, le RAPADILINO et le BGS n'induisent pas d'augmentation majeure de la fréquence des cancers, bien que quelques cas d'ostéosarcomes aient été mis en évidence chez des patients atteints de RAPADILINO, ou des cas de lymphomes chez des patients atteints de BGS (Croteau *et al.*, 2014).

Ces trois pathologies présentent quelques caractéristiques cliniques communes, notamment une malformation du squelette bien que le défaut de développement soit différent dans chaque cas. Des symptômes cliniques propres à chaque syndrome ont également été décrits (Larizza *et al.*, 2010 ; Siitonen *et al.*, 2009) et sont résumés dans le tableau 1.

Le phénotype cellulaire des patients atteints de RTS se caractérise par une forte fréquence d'aneuploïdie, de trisomie, de réarrangements chromosomiques ainsi que par des défauts de réparation des CDBs (Singh *et al.*, 2010). Les caractéristiques cellulaires des deux autres syndromes sont actuellement peu définies (Chu et Hickson, 2009).

Ces syndromes illustrent le rôle des hélicases RecQ en tant que gardiennes multifonctionnelles du génome. Pour des raisons de clarté, et étant donné la place central du syndrome de Bloom dans notre thématique de recherche, celui-ci a été traité à part et le chapitre suivant lui est consacré.

2. Le syndrome de Bloom

Le syndrome de Bloom est la conséquence de la mutation des deux copies du gène *BLM*, localisé en 15q26.1, codant pour l'hélicase du même nom (Ellis *et al.*, 1995). Il s'agit d'une maladie génétique autosomique récessive très rare, évoquée pour la première fois en 1954 par le docteur David Bloom. Dermatologue de profession, il décrit alors ce syndrome comme un « érythème télangiectasique congénital évoquant un lupus érythémateux chez des nains ». La caractéristique principale des patients étant un nanisme proportionné associé le plus souvent à un érythème du visage. Plus tard, un programme de recensement des patients (registre du syndrome de Bloom) a été mis en place dans le but de mieux caractériser ce syndrome. Il a ainsi permis de suivre 168 patients (93 hommes et 75 femmes) entre 1960 et 1991 (German, 1969 ; German *et al.*, 1977, German *et al.*, 1984, German et Passarge, 1989, German, 1995).

2.1 Phénotypes cliniques et pathologies associées

Les patients BS présentent des caractéristiques physiques plus ou moins constantes. La première étant un retard staturo-pondéral pré et post-natal qui perdure à l'âge adulte et qui n'est pas associé

à un défaut d'absorption ou à un défaut hormonal (Diaz *et al.*, 2006) (la taille des hommes varie entre 130 et 162 cms alors que celles des femmes varie entre 122 et 151 cms).

Parmi les autres caractéristiques physiques du syndrome de Bloom, on retrouve :

- Une dolicocephalie associée à une hypoplasie malaire (visage long et étroit dit « en oiseau »).
- Un érythème du visage (en forme de « masque de loup ») qui se développe dès les premières années de la vie des patients et qui apparaît après exposition au soleil.
- Des zones d'hyper- et d'hypo-pigmentation appelées taches « café au lait » et localisées sur le tronc et les extrémités.
- Une voix aigüe et nasillarde (« *Mickey mouse voice* »).

En plus de ces caractéristiques physiques, les patients BS vont également pouvoir développer différentes pathologies. Ainsi, l'origine de la première consultation de ces patients est généralement due à un déficit immunitaire modéré à sévère apparaissant durant l'enfance. Cette immunodéficience se manifeste par une sensibilité accrue aux infections des voies ORL et du tractus intestinal. Cette pathologie se résorbe progressivement avec l'âge et son origine n'est actuellement pas connue. Le registre de Bloom a également permis de mettre en évidence le fait que certains patients présentent un diabète de type non-insulino-dépendant, ainsi qu'une infertilité due à une azoospermie chez les hommes et une fertilité réduite chez les femmes associée à une ménopause précoce (German 1969, German, 1995) (Tableau 1).

2.2 Prédisposition aux cancers

La caractéristique constante majeure du syndrome de Bloom est une prédisposition tumorale qui constitue la cause de décès la plus fréquente chez les patients BS. L'étude répertoriant les cent premiers cancers développés par 71 des 168 patients du registre Bloom (Tableau 2), montre que les patients BS présentent une distribution des cancers similaire à la population générale mais un âge d'apparition beaucoup plus précoce : en moyenne 24,7 ans (German, 1997).

Le syndrome de Bloom est ainsi associé à une prédisposition à tous les types de cancers, contrairement à la plupart des autres maladies génétiques qui prédisposent à un ou plusieurs types de tumeurs spécifiques (pour revue : Knoch *et al.*, 2012). De plus, parmi les syndromes associés aux hélicases RecQ évoqués précédemment, le cas du syndrome de Bloom est unique car c'est le seul à prédisposer à un spectre si large de cancers (pour revue : Chu et Hickson, 2009).

Cette prédisposition tumorale suggère qu'un ou plusieurs évènements très précoces de la cancérogénèse ont déjà été initiés favorisant ainsi l'apparition de cancer chez les patients BS. En outre, les nombreux types de cancers pouvant être développés par ces patients suppose que cette ou ces étapes sont communes à un grand nombre de processus tumoraux. Ces deux caractéristiques font du syndrome de Bloom un modèle unique de cancérogénèse accélérée. Par conséquent, nous estimons dans l'équipe que l'étude de l'origine des anomalies cellulaires et moléculaires associées à ce syndrome constitue un enjeu majeur dans la compréhension des étapes précoces du développement de cancers.

Types de cancers	Nombre de cancers	Age moyen au diagnostic
Carcinomes (n=51)		
Langue	4	38.2
Amygdale	1	38
Canal auditif	2	31
Peau	8	26.9
Œsophage	4	40.6
Estomac	2	28.5
Colon	13	32
Larynx, épiglotte	3	29.3
Poumon	1	38
Utérus	5	21.2
Sein	7	32.4
Métastases	1	30
Lymphomes (n=23)		
Maladie de Hodgkin	2	17.5
Autres	21	19.1
Leucémies aiguës (n=21)		
Lymphocytaires	6	13
Myélocytaires	6	19.8
Autres	9	21.2
Tumeurs rares (n=5)		
Medulloblastome	1	3
Tumeur de Wilms	2	5.5
Sarcome	2	9.5

Tableau 2 : Liste des cent premiers cancers développés par 71 des 168 patients du registre de Bloom (d'après German, 1997).

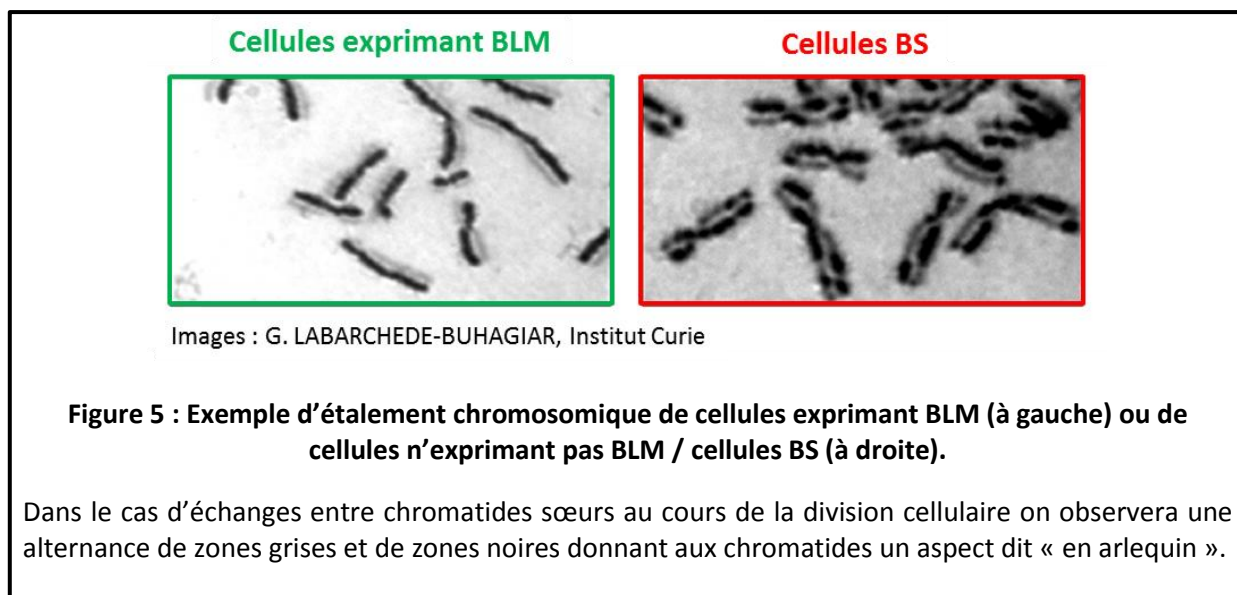
2.3 Caractéristiques cellulaires

2.3.1 Caractéristiques cytogénétiques

Le syndrome de Bloom appartient au groupe des maladies dites « cassantes » incluant l'Ataxie Téléangiectasie (AT), Xeroderma Pigmentosum (XP) et l'Anémie de Fanconi (FA). Ces maladies sont caractérisées par une forte instabilité génétique, des cassures chromosomiques spontanées ou induites, et sont associées à une prédisposition à des cancers spécifiques (pour revue : Knoch *et al.*, 2012).

L'analyse du caryotype des cellules BS a révélé des cassures chromosomiques spontanées ainsi que des réarrangements chromosomiques dans 15% des métaphases (German *et al.*, 1965). Les cellules BS ont également permis pour la première fois de montrer l'existence de « *crossing-over* » dans des cellules somatiques humaines. En effet, 1 à 5% des métaphases présentent des figures quadriradiales dues à des échanges entre chromatides non sœurs de chromosomes homologues (German, 1964 ; Chaganti *et al.*, 1974).

Néanmoins, la caractéristique cytogénétique majeure des cellules BS est une augmentation de la fréquence des échanges entre chromatides sœurs aussi appelées SCEs (« *sister-chromatid exchange* ») (Chaganti *et al.*, 1974). Les cellules BS présentent ainsi une augmentation d'un facteur 10 du taux de SCEs qu'il est possible de visualiser par coloration différentielle des chromatides sœurs. Cette technique repose sur l'utilisation combinée d'un analogue de base azotée, le 5-bromodéoxyuridine (BrdU), et d'un colorant de l'ADN, le Giemsa (Latt, 1973 ; pour revue : Wilson et Thompson, 2007), qui confère aux chromosomes issus de cellules BS un aspect particulier dit en « Arlequin » (en rouge, figure 5). L'analyse du taux de SCEs a longtemps été le seul critère diagnostique du syndrome de Bloom, mais aujourd'hui des méthodes de séquençage de l'ADN existent et un test génétique pour les populations à haut risque a même été mis sur le marché (Arora *et al.*, 2014).



Concernant l'origine moléculaire des SCEs, il a été montré au laboratoire que leur formation est strictement dépendante de la RH médiée par RAD51 (Lahkim Bennani-Belhaj *et al.*, 2010). Des données suggèrent également que les SCEs reflètent le redémarrage de fourches de réplifications bloquées par la voie de RH (Rao *et al.*, 2007).

2.3.2 Stress oxydant

Le stress oxydant est une source majeure de dommages à l'ADN. De nombreux mécanismes permettent de contrôler l'équilibre rédox, notamment via la conversion d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) en molécules inactives ne représentant plus de danger pour l'homéostasie cellulaire (pour revue : Lushshak, 2014).

Une série d'études réalisée par Nicotera et ses collègues a identifié différentes anomalies dans l'équilibre rédox des cellules BS. Ainsi, une augmentation d'un facteur 3 environ de certaines ROS telles que l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) ou le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) a été observé dans les cellules BS (Nicotera *et al.*, 1993). En réponse à l'accumulation de ces ROS, l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) à cuivre et à zinc qui catalyse la dismutation du superoxyde $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 , est augmentée de 200% (Nicotera *et al.*, 1989 ; Lee *et al.*, 1990). Une corrélation entre la fréquence des SCEs et la quantité de ROS a également été montré. Ainsi, un traitement avec des drogues entraînant l'accumulation d' $O_2^{\cdot -}$ telle que le paraquat, induit une augmentation de la fréquence des SCEs (Nicotera *et al.*, 1989). A l'inverse, un traitement des cellules BS avec un antioxydant comme l' α -tocophérol conduit à une diminution du taux de SCEs (Nicotera *et al.*, 1989).

Enfin, l'étude du sang et de l'urine de patient BS a confirmé la présence d'anomalies de l'équilibre rédox conduisant à un état pro-oxydant (Zatterale *et al.*, 2007). En effet, les cellules BS présentent une diminution du ratio de la forme oxydée du glutathion (GSSG) par rapport à la forme réduite (GSH), ce ratio étant primordiale dans le maintien de l'équilibre rédox. Une diminution de ce ratio ayant été associée à une augmentation du stress oxydant cellulaire dans l'AT (Degan *et al.*, 2007), les auteurs ont suggéré qu'il pouvait en être de même dans les cellules BS (Zatterale *et al.*, 2007).

L'ensemble de ces données démontre l'existence d'un stress oxydant constitutif dans les cellules BS dont l'origine reste à élucider.

2.3.3 Anomalies de la réplication

Les cellules BS présentent plusieurs anomalies de la réplication. Tout d'abord, un ralentissement de la vitesse de progression des fourches de réplication a été constaté dans différentes cellules BS grâce à des expériences d'autoradiographies de fibres d'ADN marquées par un pulse radioactif (Hand et German 1975, Gianneli 1977, Hand et German 1977).

Par la suite, l'étude plus précise des fourches de réplication par la technique de peignage moléculaire utilisant l'incorporation d'analogues de bases (pour revue : Herrick et Bensimon, 2009) a

permis de confirmer un ralentissement de la vitesse des fourches de réplication dans les cellules BS. Une augmentation de la fréquence de fourches asymétriques a également été décrite grâce à cette technique. Ce résultat suggère une accumulation de fourches de réplication bloquées et a été associé à un défaut de leur redémarrage. Enfin, dans cette même étude, une diminution de la distance inter-origine a été observée et associée à une augmentation de l'activation des origines de réplication dormantes (Rao *et al.*, 2007). Les auteurs de cette étude en ont conclu que les cellules BS accumulent des fourches de réplication bloquées induisant un ralentissement de la vitesse de réplication. Ce ralentissement conduit alors à une activation des origines dormantes dans le but de compenser ce dernier par l'augmentation de la quantité de fourches actives (Rao *et al.*, 2007).

2.3.4 Anomalies mitotiques

Les premières biopsies de peau de patients BS ont révélé de nombreux types d'anomalies mitotiques (Figure 6) (pour revue : Gisselsson, 2008), parmi lesquelles on retrouve une augmentation de la fréquence des ponts anaphasiques ainsi que des chromosomes retardés assimilés à des fragments chromosomiques perdus ou dont la ségrégation est retardée par une non-disjonction (German, 1969). Ces anomalies peuvent entraîner la formation de cellules anormales : cellules aneuploïdes, cellules binucléées et/ou présentant des micronoyaux (Rosin et German, 1985 ; Yankiwski *et al.*, 2000).

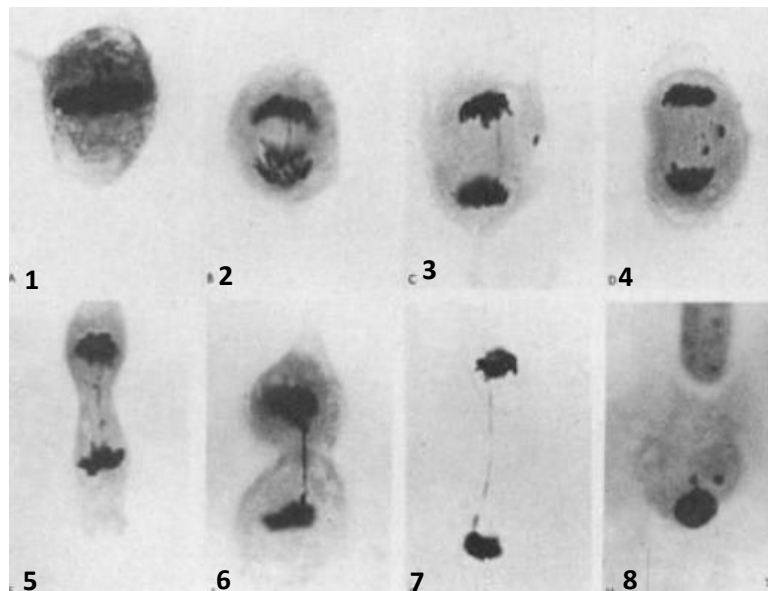
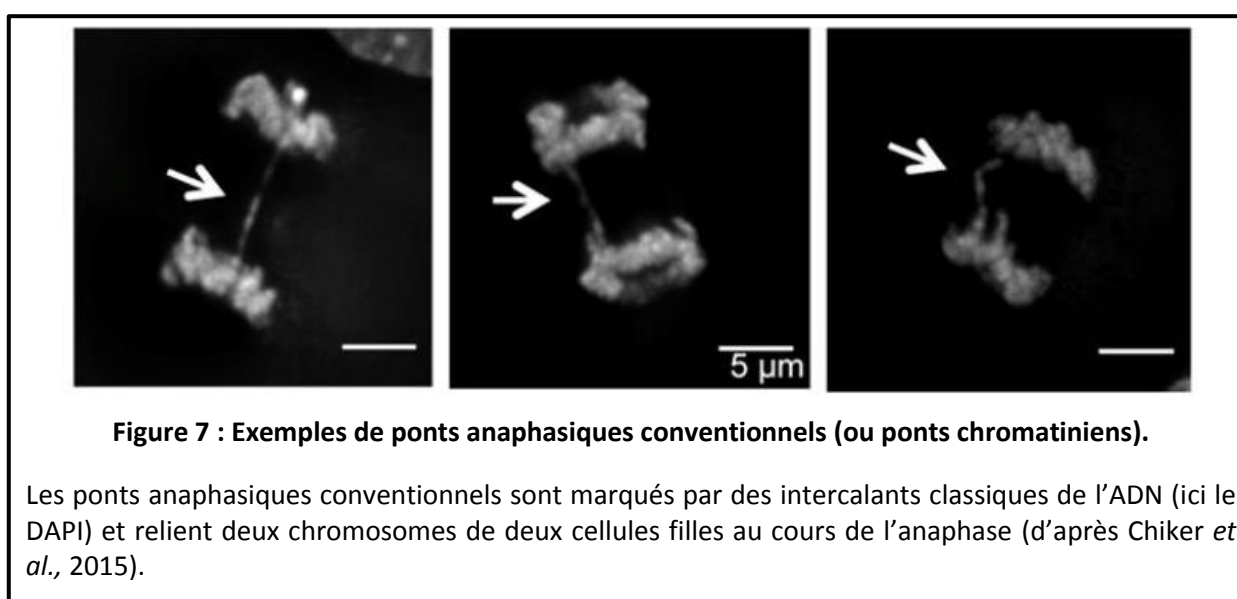


Figure 6 : Exemples d'anomalies mitotiques retrouvées sur des biopsies de peau de patients BS.

Différents exemples d'anomalies mitotiques observées en mitose dans des cellules BS. Ces exemples regroupent des ponts anaphasiques conventionnels (images 2 ; 3 ; 5 ; 6 et 7), des chromosomes retardés (images 1 et 4) et des micronoyaux (image 8) (d'après German, 1969).

L'augmentation de la fréquence des ponts anaphasiques, source d'instabilité génétique, a fait l'objet de nombreuses études et caractérisations. Ces ponts sont des structures d'ADN reliant les deux pôles d'une cellule au moment de l'anaphase. Ils peuvent être de deux types : les ponts anaphasiques conventionnels appelés aussi ponts chromatinien et les ponts anaphasiques ultrafins (UFBs : « *ultrafine anaphase bridge* »).

Les premiers correspondent à des structures pathologiques résultant de défaut de ségrégation des chromosomes au moment de l'anaphase (Gisselsson, 2008). Ils contiennent des histones et sont visualisables en immunofluorescence grâce à l'utilisation d'intercalants classiques de l'ADN tel que le DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) (Figure 7) (Chan *et al.*, 2007). Leur non-résolution est la source majeure de micronoyaux qui résulteraient de la cassure de l'ADN formant le pont, provoquée par la force du fuseau mitotique (Hoffelder *et al.*, 2004). On retrouve sur certains ponts anaphasiques conventionnels les hélicases BLM et PICH (« *Plk1 interaction checkpoint helicase* ») ainsi que des partenaires de BLM tels que la topoisomérase III α et RMI1 (Chan *et al.*, 2007), suggérant un rôle de ces protéines dans la résolution de ces structures.



Quant aux UFBs, ce sont des structures physiologiques virtuellement présentes dans toutes les lignées cellulaires (Chan *et al.*, 2007). Ils ne contiennent pas d'histones et ne sont pas marqués par des colorants classiques de l'ADN (Hoechst, DAPI, YOYO...). Leur sensibilité à un traitement ménagé avec de la DNase suggère néanmoins qu'ils correspondent à de l'ADN (Chan *et al.*, 2007). Leur découverte tardive n'a été possible que grâce à un marquage par immunofluorescence utilisant des anticorps spécifiques de deux hélicases : PICH et BLM toutes deux recrutées sur ces structures (Figure 8) (Baumann *et al.*, 2007 ; Chan *et al.*, 2007). PICH est recrutée sur les UFBs dès la métaphase lorsque

l'ADN est encore condensé au maximum tandis que BLM est recrutée plus tardivement, au moment de l'anaphase (Chan *et al.*, 2007 ; Baumann *et al.*, 2007).

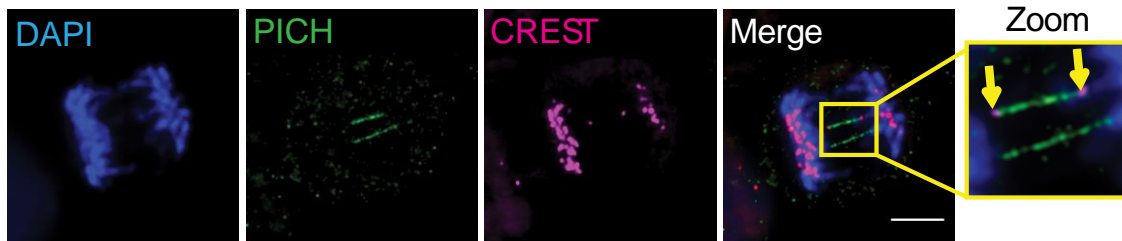


Figure 8 : Exemples d'UFBs en anaphase dans des cellules BS.

Les UFBs relient deux chromatides sœurs en mitose. Ils sont marqués par la protéine PICH (en vert), l'ADN est visualisé par du DAPI (en bleu). Cet exemple montre un UFB centromérique (en haut) reconnaissable par la présence du marqueur centromérique CREST (en magenta) aux extrémités (flèches jaunes) et un UFB d'origine non centromérique (en bas) (d'après Gemble *et al.*, 2015).

La majorité des UFBs ont une origine centromérique et sont fortement augmentés en réponse à un traitement avec des inhibiteurs de topoisomérase II α (Chan *et al.*, 2007). Quelques UFBs présentant des foyers FANCD2/FANCI à leurs extrémités ont été associés à des sites fragiles et sont induits par un traitement avec de l'aphidicoline (APH) (Chan *et al.*, 2009). Enfin, une faible proportion d'UFB peut également avoir pour origine les télomères (Barefield et Karlseder, 2012) (pour revue : Liu *et al.*, 2014).

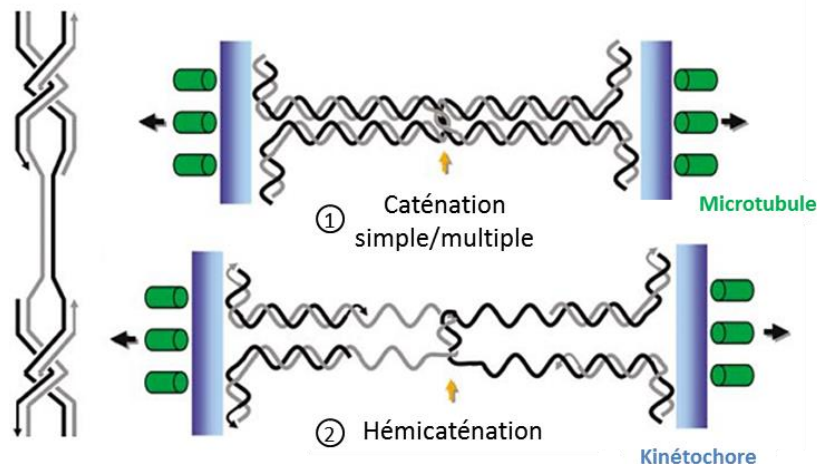


Figure 9 : Modèle de la structure des UFBs.

Les UFBs résultent de problèmes ayant eu lieu pendant la réplication. Il a été proposé que les UFBs pourraient soit ① correspondre à de l'ADN totalement répliqué mais toujours entrelacés sous forme de duplex ou caténations d'ADN soit ② correspondre à des séquences d'ADN partiellement répliquées ou hémicaténations d'ADN (panel du bas). Les kinétochores (en bleu) sont reliés aux microtubules (en vert), elles-mêmes sous tension (flèche noire) (adapté de Chan *et al.*, 2007).

Les UFBs sont le résultat de problèmes au moment de la réplication. Deux hypothèses sont actuellement proposées concernant leur formation. Ils pourraient soit dériver de caténations d'ADN non résolues avant l'entrée en mitose (① de la figure 9), soit dériver de séquences d'ADN non répliquées en fin de phase S et perdurant en mitose (② de la figure 9) (Chan *et al.*, 2007 ; pour revue : Liu *et al.*, 2014). L'augmentation de la fréquence de ces ponts en absence de BLM suggère que l'activité hélicase de cette dernière pourrait être impliquée dans la résolution de ces structures particulières d'ADN (Chan *et al.*, 2007).

Les connaissances actuelles sur les ponts anaphasiques seront plus amplement présentées et détaillées dans la section « Présentation du projet de recherche » p.161.

L'ensemble des anomalies observées dans les cellules dérivées de patients BS suggère un rôle fondamental de la protéine BLM dans la réparation des CDBs de l'ADN, dans la réplication ainsi que dans la prévention d'anomalies mitotiques.

3. La protéine BLM

3.1 Mutations connues

Actuellement 77 mutations du gène *BLM* ont été identifiées (Ellis *et al.*, 1995 ; Kaneko *et al.*, 1996 ; Foucault *et al.*, 1997 ; Calin *et al.*, 1998 ; Barakat *et al.*, 2000 ; German *et al.*, 2007 ; Amor-Guérét *et al.*, 2008) et sont répertoriées dans une base de données : « *BLMbase : Mutation registry for Bloom syndrome* » (<http://bioinf.uta.fi/BLMbase/>). La majorité de ces mutations correspond soit à des mutations non-sens, soit à des petites délétions entraînant un « décalage de phase de lecture » et conduisant à la formation d'un codon STOP prématuré entraînant la dégradation de l'ARNm par le système du NMD (« *Nonsense-mediated mRNA Decay* », données non publiées du laboratoire). Par conséquent, les protéines tronquées ne sont pas produites et les patients BS présentant ces mutations n'expriment donc pas de protéine BLM. Quelques mutations du gène sont de type faux sens et sont toutes localisées dans le « noyau hélicase ». La localisation de ces mutations suggère que la perte de la fonction hélicase de BLM est primordiale dans le développement du syndrome de Bloom.

De manière intéressante, la diversité des mutations possibles rapportée à la longueur de la séquence codante contraste avec l'incidence du syndrome de Bloom : en effet cette incidence est attendue statistiquement plus élevée. En outre, les études de German ont montré qu'au sein de

certaines fratries, moins d'enfants qu'attendus pour une maladie autosomique récessive étaient atteints du syndrome de Bloom (German, 1969). Ces observations suggèrent une mortalité accrue des embryons homozygotes provoquant des fausses couches et laissent à penser qu'il pourrait exister un mécanisme de sélection des embryons aptes à survivre en absence d'une protéine BLM fonctionnelle (German, 1969 ; Amor-Guérét *et al.*, 2008).

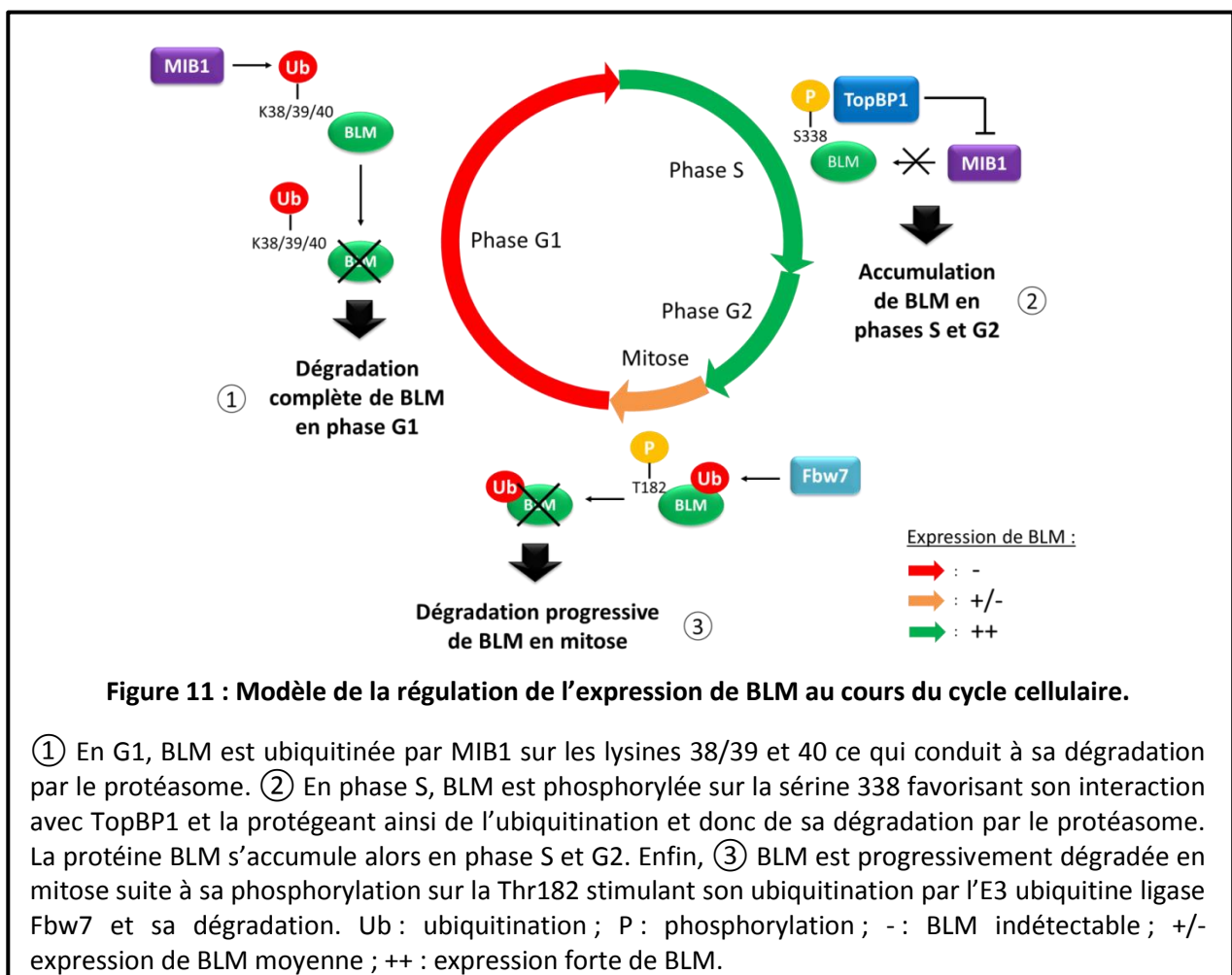
3.2 Substrats de BLM

Les anomalies de réplication (fourches de réplication bloquées) et l'augmentation du taux de SCEs observées dans les cellules BS suggèrent que BLM est capable de résoudre des intermédiaires de réplication et de RH. Ainsi, afin de mieux comprendre les étapes du métabolisme de l'ADN impliquant l'activité de BLM, des études *in vitro* ont été initiées dans le but de caractériser ses substrats (Figure 10).

La protéine BLM recombinante (BLMr) est capable de dissocier des structures de type α résultant de l'échange de brin médié par la protéine recombinante RecA de *E. Coli* (homologue de RAD51) entre un oligonucléotide simple brin et un duplex d'ADN circulaire (Karow *et al.*, 2000). De plus, BLMr peut se fixer et promouvoir la migration de branche d'une jonction de Holliday (JH) synthétique (Karow *et al.*, 2000 ; Mohaghegh *et al.*, 2001). De manière surprenante, BLMr présente également une activité d'appariement de brins d'ADN complémentaire (Cheok *et al.*, 2005) contrastant avec son activité hélicase. Il semble que l'équilibre entre l'activité hélicase et l'activité d'appariement de brins soit dépendant des conditions cellulaires. Ainsi, une forte concentration de BLMr conduit à une inhibition de son activité hélicase. A l'inverse, l'activité d'appariement de brin de BLM est stimulée par la longueur du duplex d'ADN et inhibée par la présence de la protéine RPA (Bartos *et al.*, 2006 ; Cheok *et al.*, 2005 ; Machwe *et al.*, 2006). Cette activité serait particulièrement utile pour promouvoir la régression d'une fourche de réplication (Machwe *et al.*, 2006). Ces données suggèrent un rôle *in vivo* de la protéine BLM qui pourrait participer à la stabilisation des fourches de réplication via leur régression ainsi qu'à leur redémarrage (*cette notion sera approfondie dans la section 3.6.2*).

BLMr est également capable de dissocier des structures de type G-quadruplexes en ADNs_b (Mohaghegh *et al.*, 2001 ; Sun *et al.*, 1998). Ces structures résultent de l'appariement de quatre brins d'ADNs_b par des liaisons de Hoogsteen entre des bases de guanine. On les retrouve principalement au niveau de l'ADN télomérique et de certains promoteurs (Huppert et Balasubramanian 2007 ; Mills

L'expression de BLM est régulée au cours du cycle cellulaire. De manière cohérente avec le fait que BLM soit une protéine impliquée dans la RH et la réplication, la protéine s'accumule en phase S, persiste en G2, commence à décroître en mitose puis enfin devient indétectable en G1 (Gharibyan et Youssoufian, 1999 ; Dutertre *et al.*, 2000 ; Sanz *et al.*, 2000). Des études récentes ont élucidé certains aspects de la régulation de BLM au cours du cycle via un mécanisme impliquant l'ubiquitine ligase MIB1 (« *mindbomb E3 ubiquitin protein ligase 1* »), la protéine TopBP1 (« *topoisomerase-II β -binding protein 1* ») et la phosphorylation de BLM (Wang *et al.*, 2013 ; Bhöm et Bernstein, 2014 ; Kharat *et al.*, 2015). Le modèle suivant a ainsi été proposé (Figure 11) (pour revue : Bhöm et Bernstein, 2014). En G1, BLM est ubiquitinée par MIB1 sur les lysines 38/39 et 40 ce qui conduit à sa dégradation par le protéasome (① de la figure 11). En phase S, BLM est phosphorylée sur la sérine 338 favorisant son interaction avec TopBP1 et la protégeant ainsi de l'ubiquitination et donc de sa dégradation (② de la figure 11) (Wang *et al.*, 2013). Cet aspect de la régulation de BLM par TopBP1 a néanmoins été remis en question récemment (Blackford *et al.*, 2015). Enfin, BLM est progressivement dégradée en mitose suite à sa phosphorylation sur la Thr182, pré-requise pour son ubiquitination par l'E3 ubiquitine ligase Fbw7 et sa dégradation subséquente (③ de la figure 11) (Kharat *et al.*, 2015).



Pour finir, l'expression de BLM est induite par des traitements provoquant des dommages de l'ADN ou encore des inhibiteurs de la réplication (Ababou *et al.*, 2000 ; Abadou *et al.*, 2002 ; Bischof *et al.*, 2001).

3.4 Localisation de BLM

Du fait de la présence d'un domaine de localisation nucléaire (NLS), BLM est une protéine exprimée dans le noyau où elle est localisée en condition basale au niveau de deux types de structures. La première est constituée de zones diffuses et finement granulaires appelées « *microspeckles* » (Yankiwski *et al.*, 2000 ; Zhong *et al.*, 1999). La seconde structure est constituée de foyers brillants et discrets dont le nombre et l'intensité varient en fonction du cycle cellulaire, le maximum étant atteint en fin de phase S et début de phase G2 (Bischof *et al.*, 2001 ; Yankiwski *et al.*, 2000 ; Zhong *et al.*, 1999 ; Gharibyan et Youssoufian, 1999 ; Sanz *et al.*, 2000). La majorité de ces foyers co-localisent avec les corps nucléaires ND10/PML (« *Promyoletic Leukemia Protein* ») et correspondent probablement à un lieu de stockage de la protéine BLM (Bachrati et Hickson, 2003 ; Yankiwski *et al.*, 2000 ; Yankiwski *et al.*, 2001 ; Zhong *et al.*, 1999). La SUMOylation de BLM sur les lysines 317 et 331 est nécessaire à sa localisation aux foyers PML (Eladad *et al.*, 2005 ; Zhu *et al.*, 2008). De manière intéressante, certains de ces foyers co-localisent avec des foyers de réplication visualisés par un marquage de la protéine PCNA (« *Proliferating-Cell Nuclear Antigen* ») ou grâce à l'incorporation de BrdU dans l'ADN (Yankiwski *et al.*, 2000). Il existe également une petite fraction de protéine BLM localisée au niveau des nucléoles en début de phase S (Yankiwski *et al.*, 2000 ; Yankiwski *et al.*, 2001 ; Sanz *et al.*, 2000).

La localisation de BLM, tout comme son expression, est régulée au cours du cycle cellulaire. Ainsi, BLM est hyperphosphorylée pendant la mitose, conduisant à sa solubilisation et à son exclusion de la fraction insoluble, principalement la chromatine et le cytosquelette (Dutertre *et al.*, 2000). Une fraction de BLM hyperphosphorylée reste néanmoins associée au fuseau mitotique (comprenant les centrosomes, microtubules et kinétochores) pendant la pré-métaphase (Nousiainen *et al.*, 2006). Comme évoqué précédemment, BLM est également recrutée au niveau des UFBs en mitose, de manière dépendante de sa phosphorylation sur la Thr182 par Chk1/Chk2 (Kharat *et al.*, 2015). Enfin, des études récentes menées au laboratoire ont également démontré que BLM est localisée au niveau des centromères de la phase G2 jusqu'en mitose (Rouzeau *et al.*, 2012). La présence de BLM au centromère va stimuler le recrutement de la topoisomérase II α facilitant la décaténation de certaines

séquences centromériques au moment de la transition métaphase-anaphase (Rouzeau *et al.*, 2012). *Cet aspect sera développé dans la section 3.6.5.2.*

3.5 Partenaires de BLM

Il existe de nombreuses protéines capables d'interagir avec BLM, dont la topoisomérase III α (Topo III α), RMI1, RMI2 et RPA qui composent le « *BLM core complex* » (Meetei *et al.*, 2003 ; Liu et West, 2008), la topoisomérase II α (Bhattacharyya *et al.*, 2009 ; Russel *et al.*, 2011) ainsi que RAD51 (Bischof *et al.*, 2001 ; Wu *et al.*, 2001).

3.5.1 La topoisomérase III α

Les caténations de l'ADN résultent de la réplication et correspondent à des tensions topologiques telles que des super-enroulements de l'ADN ou des entremêlements. La résolution de ces caténations est nécessaire à la cellule notamment pour terminer la réplication et permettre la séparation correcte des chromatides sœurs au moment de la mitose. Un système de relaxation de ses contraintes existe donc dans le but de maintenir l'intégrité génomique à chaque cycle cellulaire. Ce système comprend un ensemble d'enzymes spécialisées appelées topoisomérases et capable de cliver et relier des brins d'ADN (Wang *et al.*, 2002).

Il existe deux types de topoisomérases : le type IA et IB capable de cliver un seul brin d'ADN et le type II capable de cliver un duplex d'ADN. Tous les organismes disposent d'au moins une topoisomérase IA, suggérant que ce type de protéine joue un rôle crucial dans la cellule. Chez l'homme, il existe une enzyme de type IA appelée Topo III et qui se décline sous deux isoformes : α et β . Etant donné son affinité très faible pour les substrats d'ADNdb il semble que l'isomère α soit plutôt spécialisé dans la résolution d'hémicaténations (caténations d'ADNsb) (Yang, 2010). Ces structures étant formées entre autres par les hélicases RecQ, il semble logique de trouver une interaction entre ces deux familles de protéines. Ainsi, plusieurs études ont montré que BLM est capable d'interagir avec la Topo III α aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* et que cette interaction est renforcée par la présence d'ADN (Johnson *et al.*, 2000 ; Wu *et al.*, 2000).

L'interaction de BLM avec la Topo III α est nécessaire à la fonction de BLM dans la RH. Ensemble, les deux protéines vont pouvoir résoudre des intermédiaires de RH tels que des dJHs sans échange des régions flanquantes permettant de prévenir la formation de SCEs (Hu *et al.*, 2001 ; Wu et Hickson, 2003). En outre, la majorité des protéines Topo III α co-localisent dans le noyau avec les foyers PML (Hu *et al.*, 2001, Johnson *et al.*, 2000 ; Wu *et al.*, 2000) qui correspondent au lieu de

stockage de BLM. Cette localisation étant dépendante de la présence de BLM (Hu *et al.*, 2001), cela conforte l'hypothèse d'une action commune entre BLM et Topo III α .

3.5.2 RMI1 et RMI2

Parmi les autres composants du « *BLM core complex* » on retrouve les deux protéines RMI1 et RMI2 (pour « *RecQ-mediated genome instability 1/2* ») également appelées respectivement BLAP75 et BLAP18 (pour « *BLM-associated polypeptides* »). Actuellement, aucune activité catalytique n'a été décrite pour ces protéines malgré leur domaine de liaison à l'ADN.

RMI1 a été identifiée en 2005 pour sa capacité à interagir indirectement avec Topo III α et BLM (Chang *et al.*, 2005). La fonction de RMI1 dans le « *BLM core complex* » serait de stimuler l'activité de migration de branche de BLM (Bussen *et al.*, 2007) et l'activité de décaténation d'ADNsb de la Topo III α (Yang *et al.*, 2010). En conséquence, l'activité de dissolution des dJHs par le couple BLM / Topo III α est augmentée (Raynard *et al.*, 2008 ; Wu *et al.*, 2006 ; Yin *et al.*, 2005). Le rôle essentiel de RMI1 dans la résolution des dJHs par le « *BLM core complex* » a été confirmé par des expériences de siRNA montrant que sa déplétion induit une augmentation du taux de SCEs (Yin *et al.*, 2005).

RMI2 est capable d'interagir *in vitro* avec RMI1 mais ne présente qu'un très faible effet de stimulation sur l'activité de résolution des dJHs par le complexe BLM / Topo III α (Singh *et al.*, 2008 ; Xu *et al.*, 2008). Cette stimulation pourrait être due à une stabilisation du « *BLM core complex* ». En effet, *in vivo*, la déplétion de Topo III α , RMI1 ou RMI2 affecte l'expression protéique des deux autres et donc la stabilité du complexe (Singh *et al.*, 2008 ; Xu *et al.*, 2008). RMI2 semble néanmoins primordiale pour l'activité de résolution des dJHs du « *BLM core complex* » puisque l'invalidation du gène dans des cellules aviaires DT-40 conduit à une augmentation des SCEs (Singh *et al.*, 2008 ; Xu *et al.*, 2008).

3.5.3 RPA

La protéine RPA est particulièrement décrite pour sa capacité à se lier à de l'ADNsb et ainsi à le protéger lors de mécanismes particuliers tels que la RH (Richard *et al.*, 2009 ; Zou *et al.*, 2006). RPA est constituée de trois sous-unités peptidiques de 70, 32 et 14 kDa et est capable d'interagir avec plusieurs membres de la famille des hélicases RecQ (Bachrati et Hiscson, 2008). Dans le cas de BLM, une interaction a été montrée avec la sous-unité de 70 kDa (Brosh *et al.*, 2000). Cette interaction conduit à une forte stimulation de l'activité de désappariement des duplexes d'ADN de BLM (Brosh *et al.*, 2000 ; Doherty *et al.*, 2005) probablement via la capacité de RPA à stabiliser l'ADNsb suite au

désappariement ou bien via la capacité de RPA à inhiber l'activité d'appariement de brins de BLM favorisant ainsi son activité hélicase (Machwe *et al.*, 2006).

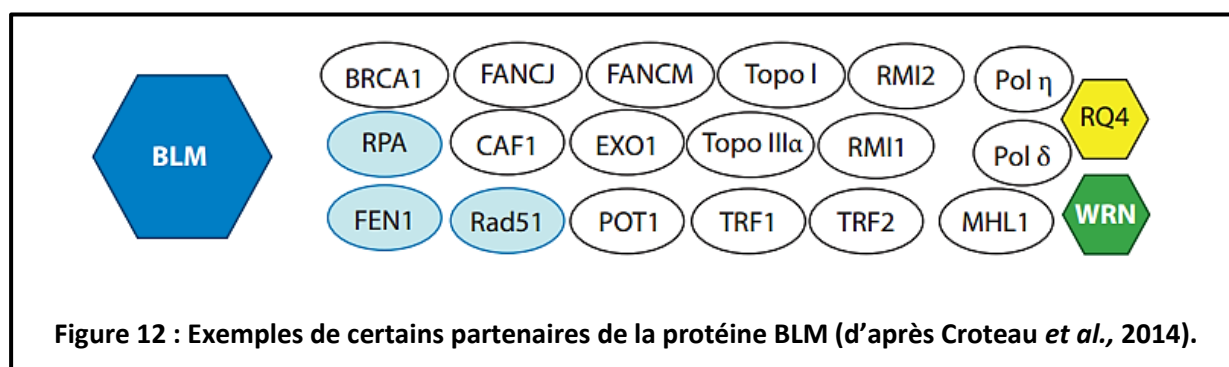
3.5.4 La topoisomérase II α

La topoisomérase II α (Topo II α) fait partie des topoisomérases de type II (*cf. section 3.5.1*). Une interaction physique a été montrée entre BLM et cette protéine ainsi qu'une co-localisation dans plusieurs lignée humaines et ce, principalement pendant les phases G2 et M (Bhattacharyya *et al.*, 2009 ; Russel *et al.*, 2011). Certaines cassures chromosomiques observées dans les cellules BS ou dans les cellules déficientes en Topo II α sont dépendantes de cette interaction ce qui suggère une activité commune des deux protéines dans la prévention des cassures d'ADN (Russell *et al.*, 2011). De manière intéressante, l'inhibition de la Topo II α induit une augmentation de la fréquence des SCEs. Cette augmentation est beaucoup plus importante que dans les cellules BS (Dillehay *et al.*, 1989 ; Ishii and Bender, 1980 ; Pommier *et al.*, 1985) ce qui pourrait être dû au fait que, *in vitro*, la Topo II α augmente l'activité de désappariement de duplexe d'ADN de BLM sur des substrats présentant des intermédiaires précoces de RH (Russell *et al.*, 2011). *In vitro*, BLM ne semble pas capable d'influencer l'activité de décaténation de la Topo II α sur des caténations d'ADN de séquences non spécifiques (Russell *et al.*, 2011). Néanmoins, une étude récente menée au laboratoire a identifié une interaction fonctionnelle entre BLM et l'activité de décaténation de la Topo II α *in vivo*. En effet, nous avons montré que l'activité hélicase de BLM et son recrutement au centromère pourraient favoriser l'accès de la Topo II α à certaines séquences centromériques facilitant leur décaténation (Rouzeau *et al.*, 2012). *Cet aspect sera développé dans la section 3.6.5.2.*

3.5.5 La recombinaise RAD51

La recombinaise RAD51 est une protéine clé de la RH, capable de s'assembler sur de l'ADNsb ou de l'ADNdb pour former un polymère que l'on appelle nucléofilament. La formation de ce nucléofilament sur de l'ADNsb constitue une étape critique de la RH et est essentielle dans le processus de recherche d'homologie, d'appariement homologue et d'échange de brin (Valerie et Povirk, 2003). Une interaction physique et une co-localisation partielle entre BLM et RAD51 a été observée en fin de phase S ainsi qu'en G2 (Bischof *et al.*, 2001 ; Wu *et al.*, 2001). De manière intéressante cette co-localisation augmente après dommages à l'ADN (Ouyang *et al.*, 2009 ; Wu *et al.*, 2001). Enfin, une étude menée au laboratoire a permis de montrer que la formation des SCEs caractéristique des cellules BS était entièrement dépendante de la RH médiée par RAD51 (Lahkim-Belhaj *et al.*, 2010).

Les autres partenaires de BLM sont pour la plupart impliqués dans le métabolisme de l'ADN (Hickson, 2003 ; Amor-Guéret, 2006 ; Croteau et al., 2014) laissant ainsi présager des fonctions de BLM. La figure 12 regroupe les partenaires principaux de BLM.



3.6 Fonctions de BLM

3.6.1 BLM et stress de réplication

La duplication complète et correcte des chromosomes est essentielle pour maintenir la stabilité du génome. Certains   v  nements peuvent cependant perturber le programme de réplication de l'ADN : on parle alors de stress de réplication (pour revue : Magdalou et al., 2014). Certaines drogues permettent de reproduire ce type de stress et ont permis de proposer plusieurs rôles de BLM au cours de la réplication et de la réparation de l'ADN. Parmi ces drogues on retrouve l'HU, inhibiteur de la ribonucléotide réductase, l'APH, inhibiteur de la polymérase α , ou bien la camptothécine (CPT), inhibiteur de la topoisomérase I.

- L'HU inhibe l'activité enzymatique de la ribonucléotide réductase (RNR) qui catalyse la réduction des nucléotides diphosphates (NDPs) en désoxynucléotides diphosphates (dNDPs) utilisés lors de la réplication. Le traitement de cellules avec de l'HU provoque ainsi une chute drastique du pool de dNTPs à l'origine d'un ralentissement sévère de la progression des fourches de réplication aboutissant à leur blocage, voire même à des CDBs en cas de traitement prolongé (Saintigny et al., 2001). Un traitement avec de l'HU conduit à l'accumulation de la protéine BLM (Ababou et al., 2002) et à sa phosphorylation sur les thréonines 99 et 122 (Cimprich et Cortez, 2008). Cette phosphorylation est essentielle à la reprise du cycle cellulaire post-traitement et est indispensable pour la relocalisation de BLM des foyers PML vers des foyers nucléaires beaucoup plus nombreux et localisés au niveau des fourches de réplication endommagées (Davalos et al., 2004 ; Davies et al., 2004). Ces foyers contiennent également d'autres protéines impliquées dans la réparation des dommages de l'ADN, notamment les protéines p53, 53BP1 et RAD51, elles-mêmes nécessaires au

recrutement de BLM (Sengupta *et al.*, 2004). BLM est également phosphorylée par la kinase Chk1 (« *Checkpoint kinase 1* ») au niveau de la sérine 646. Après traitement avec de l'HU cette phosphorylation diminue, favorisant le recrutement de BLM au niveau des cassures de l'ADN (Kaur *et al.*, 2010). Enfin, il a été montré que la proportion de fourches bloquées ne redémarrant pas après HU était plus importante dans les cellules BS (Rao *et al.*, 2007). L'ensemble de ces résultats suggère un rôle de BLM dans la réparation des CDBs et une implication dans le redémarrage des fourches de réplication bloquées.

Concernant la sensibilité à l'HU, des études ont d'abord montré que les cellules BS présentaient une sensibilité accrue à cette drogue (Davalos et Campisi, 2003 ; Davies *et al.*, 2004 ; Pichierri *et al.*, 2004). Néanmoins, des travaux menés au laboratoire ont permis de montrer que ces études étaient sans doute biaisées par la concentration élevée d'HU utilisée ou par la très longue durée du traitement. En effet, à forte dose l'HU, conduit à une quantité plus importante de CDBs dans les cellules BS par rapport aux cellules contrôles. Les cellules BS ne présentent ainsi pas de sensibilité lorsque les concentrations d'HU utilisées induisent le même nombre de CDBs dans les cellules BS que dans leur contrôle. Ces données suggèrent que les cellules BS ne présentent pas de sensibilité à l'HU mais aux CDBs provoquées par l'HU (Lahkim Bennani-Belhaj *et al.*, 2010).

- L'APH est un inhibiteur de la polymérase α conduisant au ralentissement de la vitesse de progression des fourches de réplication et donc à un stress de réplication. BLM est requise pour le redémarrage des fourches de réplication et la suppression de l'activation des origines de réplication en réponse à un traitement avec de l'APH (Davies *et al.*, 2007), confirmant les observations faites précédemment en réponse à un traitement avec de l'HU.

- La CPT est un inhibiteur de la topoisomérase I entraînant la stabilisation de l'enzyme sur le brin d'ADN qu'elle vient de cliver. Le complexe ADN/Topo I va représenter un obstacle pour la fourche de réplication induisant son effondrement et la formation d'une CDB. Les fibroblastes BS présentent une sensibilité accrue à la CPT associée à un retard de phosphorylation de H2AX et à une quantité plus importante de complexes ADN/Topo I. En réponse à la CPT, BLM est phosphorylée sur la thréonine 99 par ATM et ATR et co-localise avec les foyers γ H2AX (Rao *et al.*, 2005), suggérant un rôle de BLM dans la réparation des CDBs.

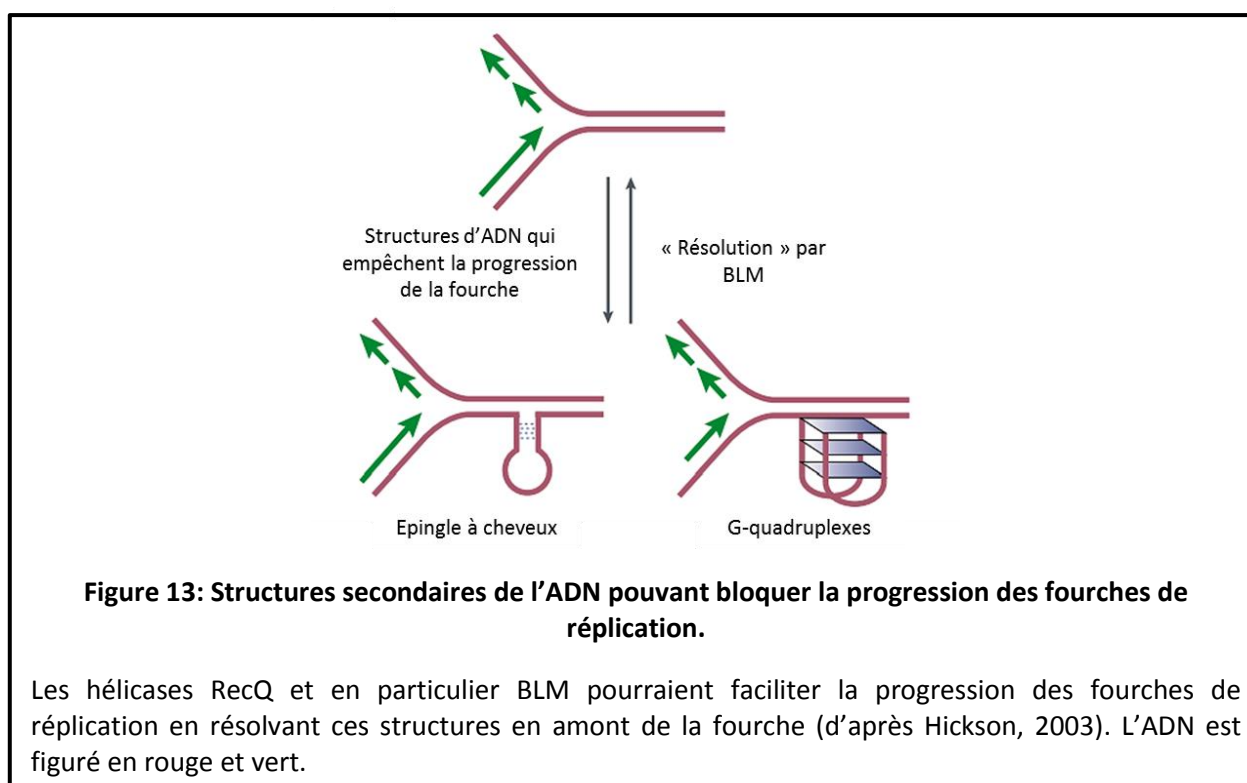
Enfin, il a récemment été montré que BLM joue un rôle primordial lors d'un stress de réplication en facilitant la dissolution de substrats recombinogènes au niveau des fourches de réplication (Kohzaki *et al.*, 2012 ; pour revue : Manthei et Keck, 2013) laissant présager un rôle de BLM au cours de la RH.

En adéquation avec les données *in vitro* sur les substrats de BLM, ces résultats suggèrent une fonction de BLM au cours de la réplication, pour soutenir la progression des fourches de réplication, mais également dans la réparation des CDBs médiée par la RH.

3.6.2 BLM et réplication

Les implications de BLM au cours de la réplication reposent sur deux aspects : prévenir la rencontre des fourches de réplication avec des structures pouvant induire leur blocage et favoriser leur stabilisation/redémarrage lorsqu'elles rencontrent malgré tout un obstacle.

Comme évoqué au début de ce manuscrit, il existe de nombreux obstacles pouvant interférer avec la progression des fourches de réplication et ainsi menacer le programme de réplication (pour revue : Magdalou *et al.*, 2014). Par exemple, les polymérases classiques sont incapables de répliquer un ADN à partir d'une matrice comprenant des structures secondaires de l'ADN. Parmi ces structures, on retrouve notamment les G-quadruplexes et les structures en épingle à cheveux (pour revue : León-Ortiz *et al.*, 2014), toutes deux étant des substrats de BLM. En adéquation avec l'augmentation du nombre de fourches de réplication bloquées dans les cellules BS, il a été proposé qu'une des fonctions de BLM serait de faciliter la progression des fourches de réplication via la résolution en amont des fourches de structures d'ADN pouvant les bloquer (Hickson, 2003 ; Sidorova *et al.*, 2013) (Figure 13).



De plus, lorsque la progression d'une fourche de réplication est entravée par une lésion, son effondrement, qui pourrait provoquer des CDBs, peut-être évité par le biais de sa stabilisation. Pour cela, la fourche régresse dans une configuration particulière dite en « *chicken foot* » permettant de l'immobiliser le temps d'éliminer l'obstacle (Mazloum et Holloman, 2009 ; Ralf *et al.*, 2006). L'activité d'appariement de brins de BLM (Machwe *et al.*, 2006) pourrait promouvoir la formation de cette structure stabilisant la fourche le temps de réparer la lésion, puis l'activité de migration de branche inverse, elle aussi médiée par BLM (Karow *et al.*, 2000), pourrait permettre le redémarrage de la fourche (① de la figure 14) (Hickson 2003, Amor-Guéret, 2006). Dans le cas où cette réparation ne pourrait pas avoir lieu, la synthèse d'ADN du brin avancé pourrait continuer en se servant du brin retardé comme matrice permettant d'outrepasser la lésion (② de la figure 14).

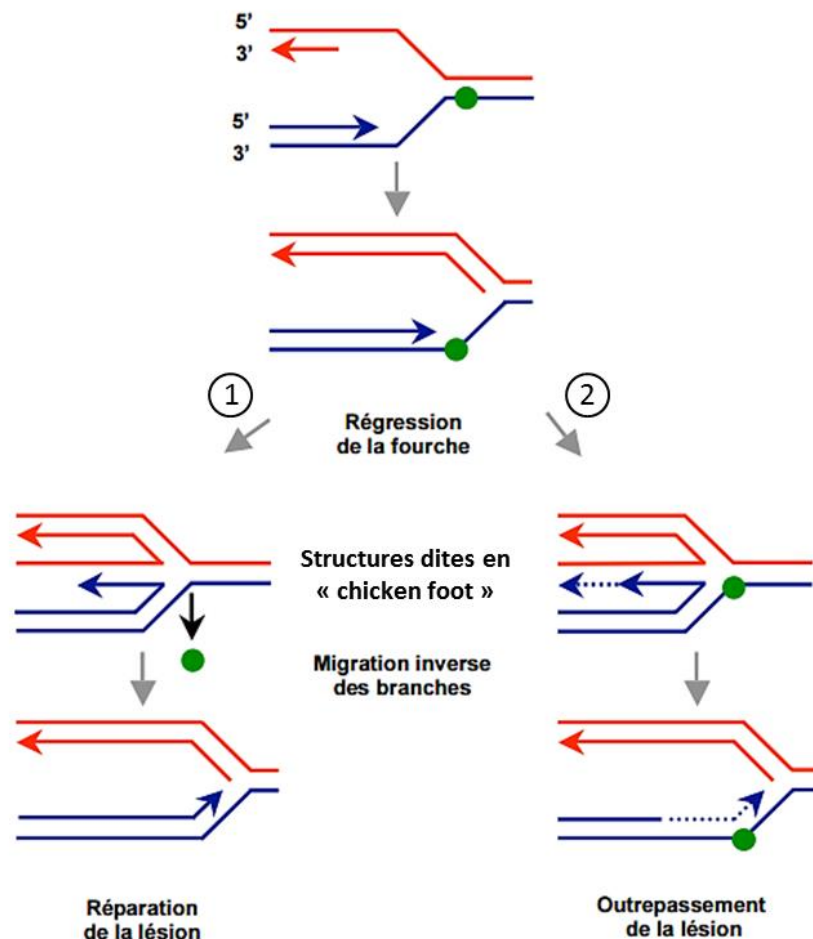


Figure 14 : Modèle de redémarrage par BLM d'une fourche de réplication bloquée.

La régression de la fourche de réplication permet de stabiliser la fourche et donner ainsi un délai suffisant à la cellule pour soit ① réparer la lésion, soit ② l'outrepasser après avoir continué la synthèse du brin avancé en se servant du brin retardé comme matrice. L'ADN est figuré en rouge et bleu. La lésion est représentée par un rond vert.

Cependant, la principale faiblesse de ce modèle réside dans le fait qu'il est nécessaire d'avoir dissociation de la machinerie de réplication au niveau de la fourche pour permettre sa régression. Or sa « re-mise » en place n'est pas encore très claire (Bugreev *et al.*, 2011 ; pour revue : Petermann et Helleday, 2010).

Enfin, BLM est également capable de favoriser le redémarrage des fourches de réplication par une voie médiée par la RH qui sera décrite dans la section suivante.

3.6.3 BLM et recombinaison homologue

De nombreux arguments sont en effet en faveur d'un rôle essentiel de BLM dans la RH. Il est ainsi proposé qu'elle puisse jouer un rôle lors de la réparation des CDBs mais aussi lors du redémarrage des fourches de réplication médié par la RH.

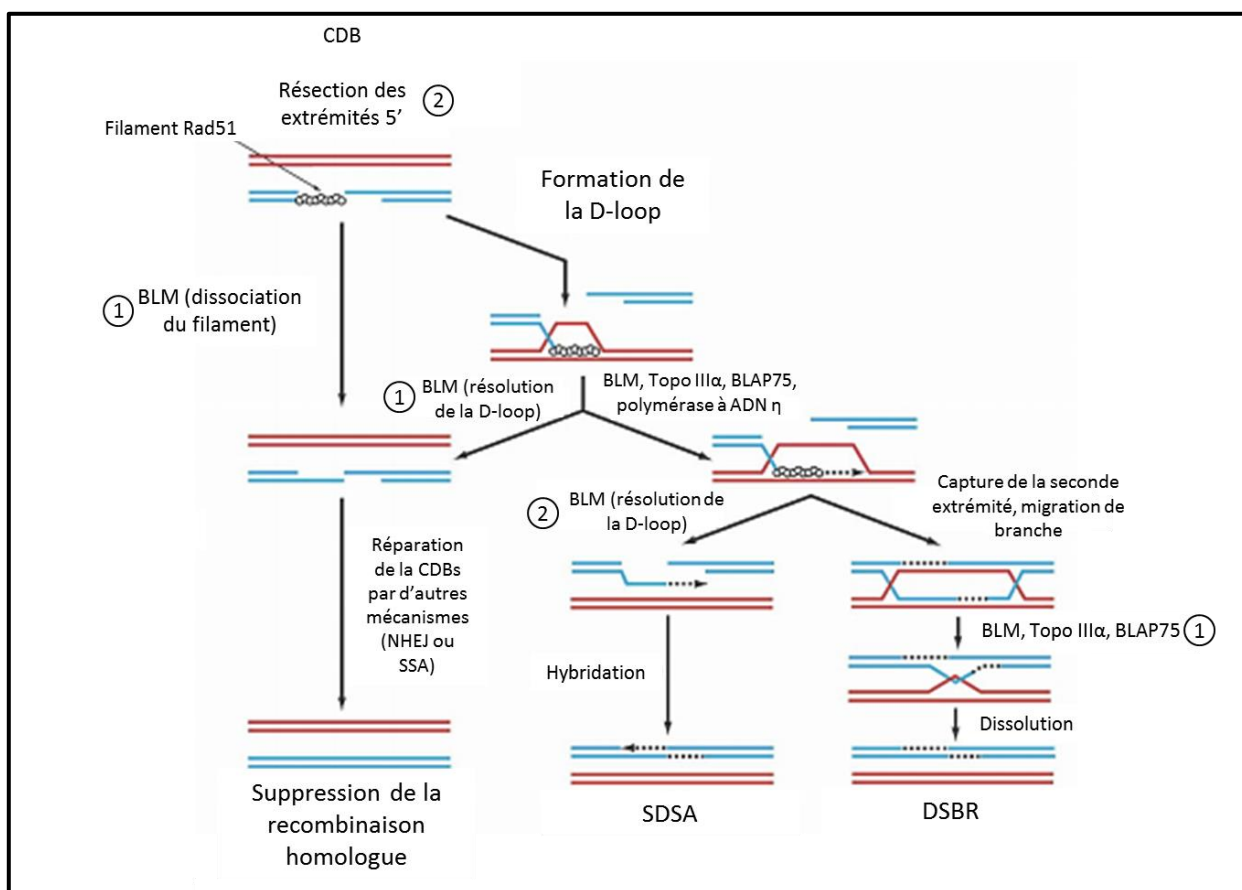


Figure 15 : Rôle de BLM dans la réparation des CDBs par la voie de la RH.

Les différentes fonctions anti-recombinogènes ① et pro- recombinogènes ② de BLM sont indiqués sur ce modèle. L'ADN est figuré en bleu et rouge (adapté de Bugreev *et al.*, 2007).

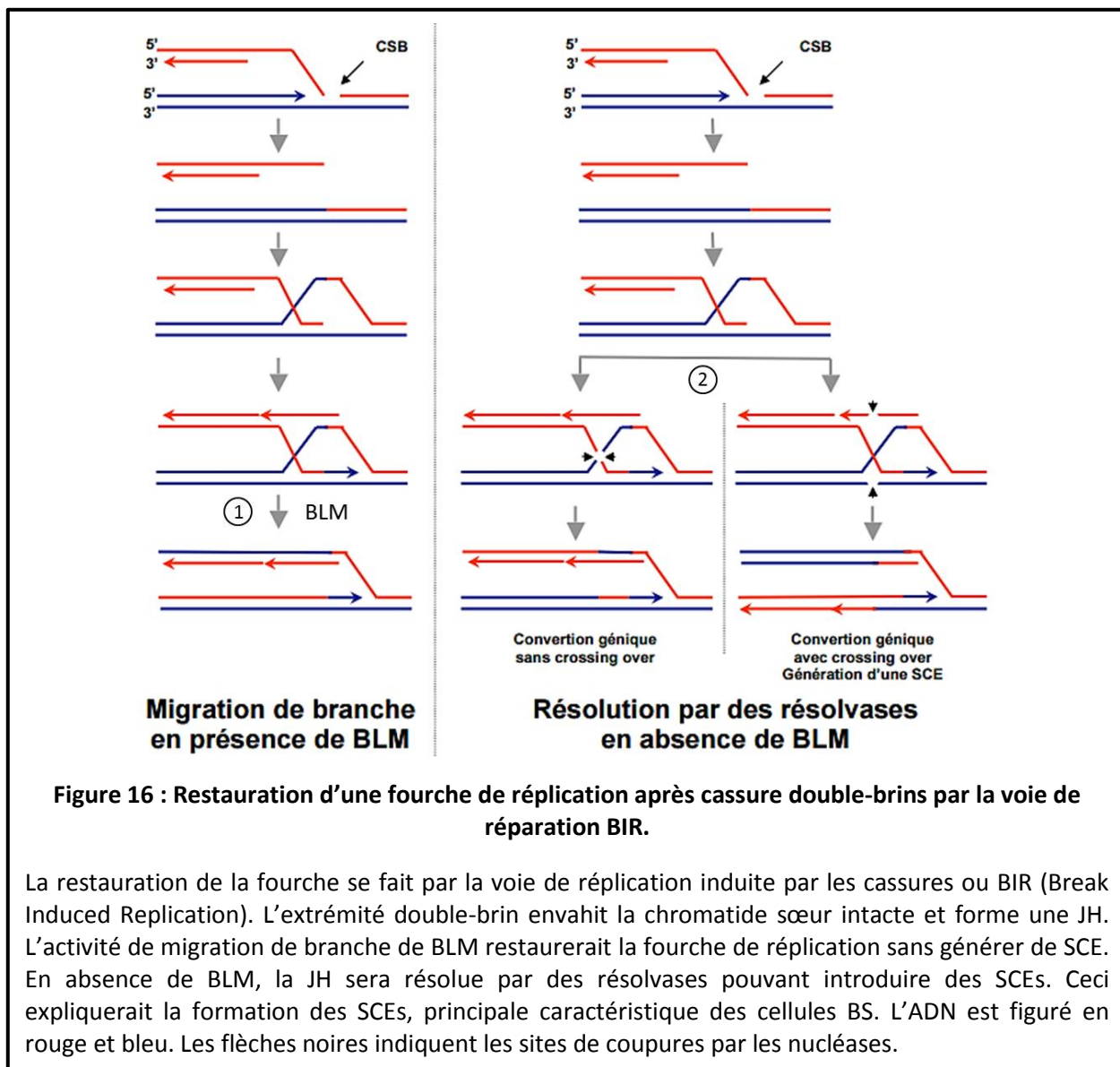
Lors de la réparation des CDBs, BLM va pouvoir, en fonction du contexte, à la fois stimuler ou inhiber les voies de la RH. Ainsi, les rôles anti-recombinogènes de BLM sont principalement associés à

sa capacité à résoudre des structures secondaires de l'ADN. En effet, BLM résout les dJHs sans « *crossing-over* » (Wu et Hickson, 2003), mais aussi les D-loops (① de la figure 15). De plus, de par une activité translocase, BLM peut déstabiliser le nucléofilament RAD51, considéré comme le point de contrôle majeur de la RH, inhibant ainsi l'invasion de brin et donc la RH (① de la figure 15) (Bugreev *et al.*, 2007 ; van Brabant *et al.*, 2000 ; Wu et Hickson, 2003). A l'inverse, BLM possède également une activité pro-recombinogène (Adams *et al.*, 2003 ; McVey *et al.*, 2004). Ainsi, *in vitro*, elle participe à la dégradation nucléolytique de l'extrémité 5' d'une CDB, générant des extrémités 3' débordantes constituant un substrat pour la fixation de RAD51 (② de la figure 15) (Nimonkar *et al.*, 2008). BLM favorise également l'activité d'échange de brins du nucléofilament de RAD51 lorsque celle-ci est sous forme active liée à l'ATP, ainsi que la résolution de la D-loop une fois la synthèse de l'ADN sur le brin homologue terminée (② de la figure 15) (Bugreev *et al.*, 2009).

L'état de SUMOylation et/ou d'ubiquitination de BLM représente la principale façon de réguler la balance entre ses activités pro- et anti-recombinogènes (Eladad *et al.*, 2005 ; Ouyang *et al.*, 2013 ; pour revue : Böhm et Bernstein, 2014). Par exemple, la SUMOylation de BLM favorise son interaction avec RAD51 (Ouyang *et al.*, 2009) ce qui pourrait favoriser le recrutement ou le maintien de RAD51 au niveau de l'ADNsb promouvant la recherche d'homologie et l'invasion de brin. A l'inverse, l'ubiquitination de BLM sur les lysines 105, 225 et 259 par l'ubiquitine ligase RNF8/RNF168 favorise son interaction avec la protéine RAP80 et stimule l'activité anti-recombinogène de BLM par un mécanisme encore peu compris (Tikoo *et al.*, 2013).

En plus de sa capacité à réguler la réparation des CDBs, BLM est également impliquée dans le redémarrage des fourches de réplication médié par la RH. En effet, lorsque la fourche entre en collision avec des cassures simples brins (CSBs) cela conduit à un chromosome intact d'un côté et à une CDB de l'autre. La restauration de la fourche se fait alors par la voie de réplication induite par les cassures ou BIR (« *Break Induce Replication* ») (pour revue : Carr et Lambert, 2013). L'extrémité double brins envahit la chromatide sœur intacte et forme une JH. BLM étant capable de résoudre les JH, il a été proposé que l'activité de migration de branche de BLM puisse restaurer la fourche de réplication sans générer de cassures (pour revue : Amor-Guéret, 2006) (① de la figure 16). En absence de BLM, la fourche sera résolue par des résolvases qui vont induire des CDBs de l'ADN qui seront ensuite réparées par RH. Ceci expliquerait la formation des SCEs caractéristiques des cellules BS (pour revues : Amor-Guéret, 2006 ; Wu, 2007) (② de la figure 16).

Ainsi, de par ses capacités à promouvoir la fidélité de la RH et à supprimer les réactions menant à des « *crossing-overs* » (Manthei et Keck, 2013; Wu et Hickson, 2003), BLM permet de prévenir la formation de substrats recombinogènes délétères pour la cellule.



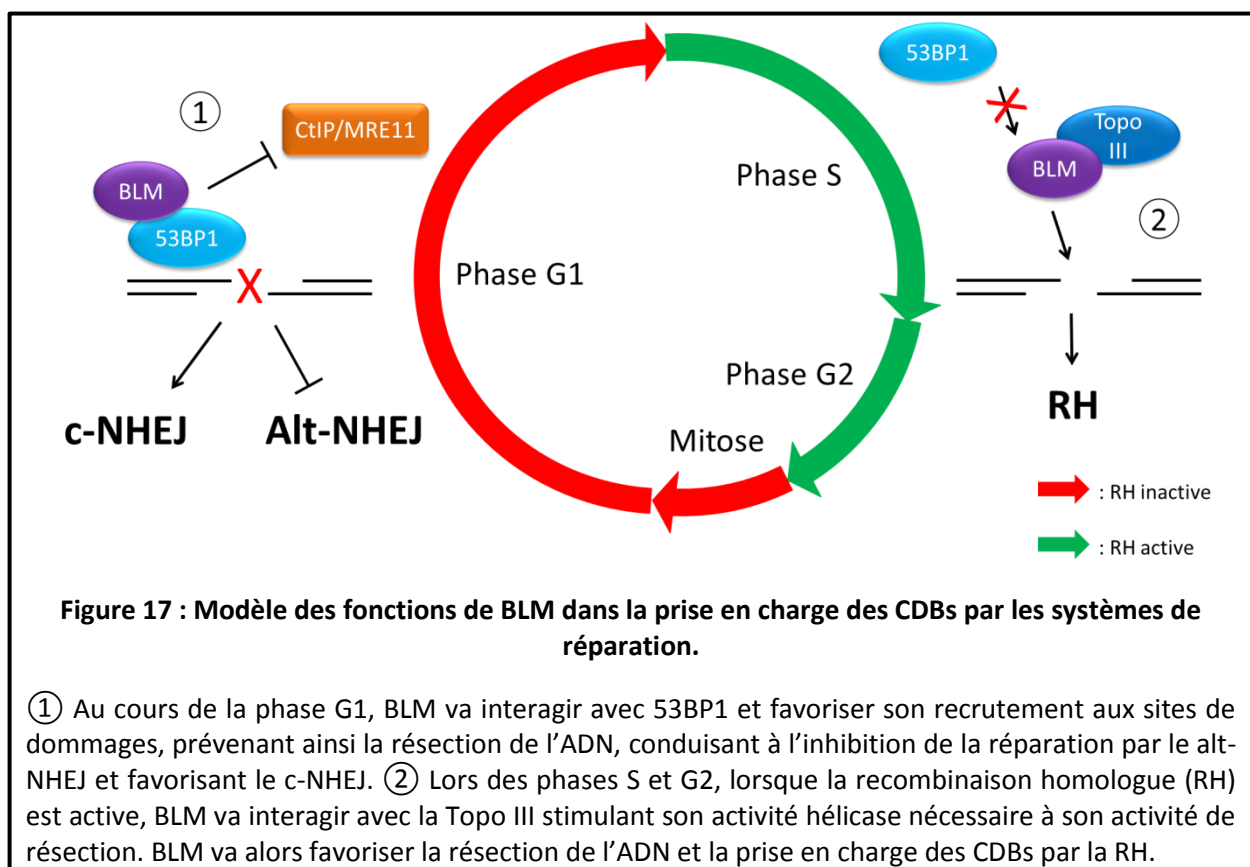
3.6.4 BLM et « non homologous end joining » (NHEJ)

Le NHEJ (« non homologous end joining ») constitue un autre mécanisme de réparation des CDBs permettant une religature des extrémités sans nécessiter de séquences homologues. Ce mécanisme se dissocie en deux voies : la voie canonique ou classique (c-NHEJ), qui constitue un mécanisme fidèle, et la voie alternative (alt-NHEJ), source de réarrangements chromosomiques (Virsik-Kopp, 2003) et dont la présence est révélée en absence des protéines clés du c-NHEJ (pour revues : Williams *et al.*, 2014 ; Bétermier *et al.*, 2014).

Contrairement à la RH qui est active uniquement en phases S et G2, le alt-NHEJ est actif tout au long du cycle cellulaire. Les premières étapes du alt-NHEJ et de la RH sont communes et consistent en une résection de l'ADN par le complexe CtIP/MRE11. Afin de maintenir la stabilité du génome, la résection de l'ADN doit donc être inhibée en G1 afin d'éviter la réparation des CDBs par le alt-NHEJ,

favorisant ainsi la réparation par un mécanisme fidèle tel que le c-NHEJ. Une étude a récemment proposé un modèle intéressant impliquant BLM dans la régulation de cette étape de résection (Grabarz *et al.*, 2013).

En effet, BLM agit de manière épistatique avec les protéines 53BP1 et Rif1 pour protéger l'ADN contre les événements de longues délétions (>200 nucléotides) médiés par le couple CtIP/MRE11. Pour cela, BLM va interagir avec 53BP1, permettant le recrutement de cette dernière aux sites de dommages de l'ADN. Etant donné que 53BP1 est capable de protéger l'ADN contre la résection (Bunting *et al.*, 2010 ; Zimmermann et de Lange, 2014), il a été proposé que son recrutement dépendant de BLM permette de prévenir la résection nécessaire à l'initiation du alt-NHEJ. De manière intéressante, en absence de 53BP1 et de Rif1, BLM aurait un rôle inverse puisqu'elle favoriserait la résection extensive de l'ADN. Enfin, il est important de noter que la déplétion dans les cellules BS de CtIP conduit à une diminution partielle du taux de SCE suggérant qu'au moins une partie des SCEs associées au syndrome de Bloom sont dépendantes de la résection de l'ADN. Ces données suggèrent que BLM pourrait posséder un double rôle : ❶ protéger contre la résection extensive médiée par CtIP/MRE11 et associée au alt-NHEJ et à l'inverse ❷ promouvoir la résection de l'ADN (Grabarz *et al.*, 2013).



Un modèle a ainsi été proposé. Au cours de la phase G1, BLM va interagir avec 53BP1 et permettre son recrutement aux sites de dommages, prévenant ainsi la résection de l'ADN. Ceci va conduire à l'inhibition de la réparation par le alt-NHEJ à la faveur du c-NHEJ, considéré comme étant un mécanisme fidèle (① de la figure 17). A l'inverse, lors des phases S et G2, lorsque la RH est active, BLM va interagir avec la Topo III α stimulant son activité hélicase (Nimonkar *et al.*, 2011), elle-même nécessaire à son activité de résection (Grabarz *et al.*, 2013). En association avec DNA2 et RPA (Sturzenegger *et al.*, 2014), BLM va alors favoriser la résection de l'ADN et la prise en charge des CDBs par la RH (② de la figure 17).

3.6.5 BLM et télomères

Les télomères sont des complexes ADN-protéines situés aux extrémités des chromosomes et jouant un rôle primordial dans le maintien de la stabilité du génome, dans la survie cellulaire et la prolifération (pour revue : O'Sullivan et Karlseder, 2010). Les séquences télomériques forment des structures hautement ordonnées telles que des D-loop (alors appelées T-loop) ou des G-quadruplexes qui doivent être résolues afin de permettre la réplication correcte des télomères (Griffith *et al.*, 1999 ; T. de Lange, 2004 ; pour revue : Giardini *et al.*, 2014).

Les cellules déplétées en BLM présentent un ralentissement de la vitesse des fourches de réplication au niveau des télomères, corrélée à une augmentation de la quantité de G-quadruplexes (Drosopoulos *et al.*, 2015). La déplétion de BLM résulte également en une augmentation de l'association des télomères entre les bras des chromosomes homologues, probablement due à des intermédiaires de réplication non résolus (Lillard-Wetherell *et al.*, 2004 ; Barefield et Karlseder, 2012). De plus, BLM est recrutée aux télomères (Barefield et Karlseder, 2012), et interagit avec les protéines télomériques TRF1, TRF2 (« *telomeric repeat factor 1/2*») et POT1 (« *protection of telomere 1* ») stimulant sa propre activité de dissociation des T-loop télomériques (Opresko *et al.*, 2002 ; Lillard-Wetherell *et al.*, 2004 ; Opresko *et al.*, 2005 ; Lee *et al.*, 2011). Ainsi, ces données suggèrent que BLM pourrait favoriser la réplication correcte des télomères en facilitant notamment la progression des fourches de réplication grâce à la résolution, en amont des fourches, de structures complexes de l'ADN (Opresko *et al.*, 2005 ; Lee *et al.*, 2011 ; Drosopoulos *et al.*, 2015).

Néanmoins, la plupart de ces études ont été réalisées dans des cellules utilisant un mécanisme alternatif de maintien de la longueur des télomères (ALT). Ainsi, l'implication de BLM dans la réplication des télomères dans des fibroblastes humains reste peu claire pour l'instant (Stavropoulos *et al.*, 2002 ; Sfeir *et al.*, 2009 ; Yankiwski *et al.*, 2000 ; Opresko *et al.*, 2005 ; Barefield et Karlseder,

2012). En outre, une étude réalisée sur des cellules dérivées de patients Bloom a conclu que ces derniers ne présentent pas d'anomalies majeures au niveau des télomères (Yankiwski *et al.*, 2000).

3.6.6 BLM en mitose

La transmission équitable du patrimoine génétique entre les cellules filles est assurée durant la dernière étape du cycle cellulaire : la mitose, comprenant la ségrégation des chromatides sœurs et l'individualisation des cellules filles (pour revue : Burgress *et al.*, 2014).

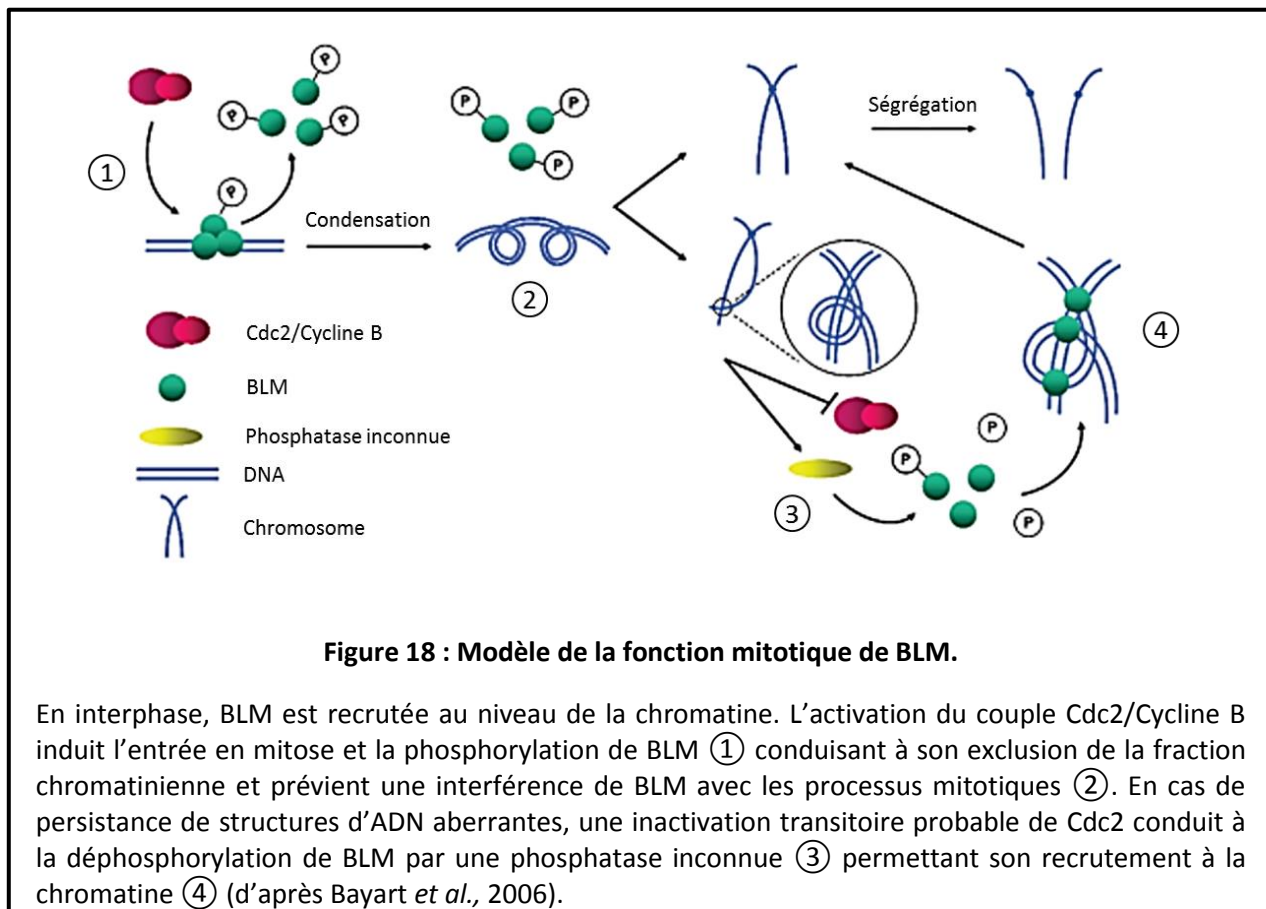
3.6.6.1 Phosphorylations de BLM

La protéine BLM va subir plusieurs modifications pendant la mitose permettant ainsi de réguler sa localisation afin de ne pas interférer avec les processus mitotiques. Ainsi, une série d'études menée au laboratoire a montré que BLM est hyperphosphorylée en mitose entraînant son exclusion de la fraction associée à la chromatine et à la matrice nucléaire (Dutertre *et al.*, 2000). Un traitement par des rayonnements ionisants provoquant l'inactivation de la kinase Cdc2 entraîne une déphosphorylation de BLM conduisant à sa relocalisation dans la fraction chromatinienne afin de permettre la réparation de l'ADN endommagé (Dutertre *et al.*, 2002). De la même manière, l'inactivation de Cdc2 par un traitement à la roscovitine provoque la déphosphorylation de BLM et sa relocalisation chromatinienne (Bayart *et al.*, 2004). Finalement, il a été montré que la protéine BLM est un substrat direct de Cdc2 qui va la phosphoryler sur au moins deux sites : la sérine 714 et la thréonine 766 (Bayart *et al.*, 2006).

La localisation de BLM va donc être régulée par sa phosphorylation par la kinase Cdc2 qui va permettre son exclusion ou non de la chromatine. Le modèle suivant a ainsi été proposé : l'activation du complexe Cdc2/Cycline B déclenche l'entrée en mitose et la protéine BLM est alors hyperphosphorylée (① de la figure 18). Cette hyperphosphorylation de BLM permet son exclusion de la fraction chromatinienne afin d'éviter d'interférer avec les processus mitotiques comme la condensation des chromosomes (② de la figure 18). Si des structures chromosomiques particulières complexes persistent durant la mitose, la kinase Cdc2 est momentanément inactivée permettant alors l'activation d'une phosphatase encore inconnue qui va déphosphoryler BLM (③ de la figure 18). BLM va alors être recrutée au niveau de ces structures pour permettre leur résolution (④ de la figure 18) (Bayart *et al.*, 2006).

Plusieurs autres sites de phosphorylation de BLM mitotique ont été décrits. MPS1, kinase clé du contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique, va notamment être capable de phosphoryler BLM sur les sérines 144, 1290 et 1296 (Leng *et al.*, 2006). La phosphorylation de la sérine 144 a une

importance particulière puisqu'elle permet l'interaction avec Plk1 (« *Polo-like kinase 1* ») et semble primordiale pour maintenir la stabilité des chromosomes pendant la mitose (Leng *et al.*, 2006).



3.6.6.2 BLM aux centromères

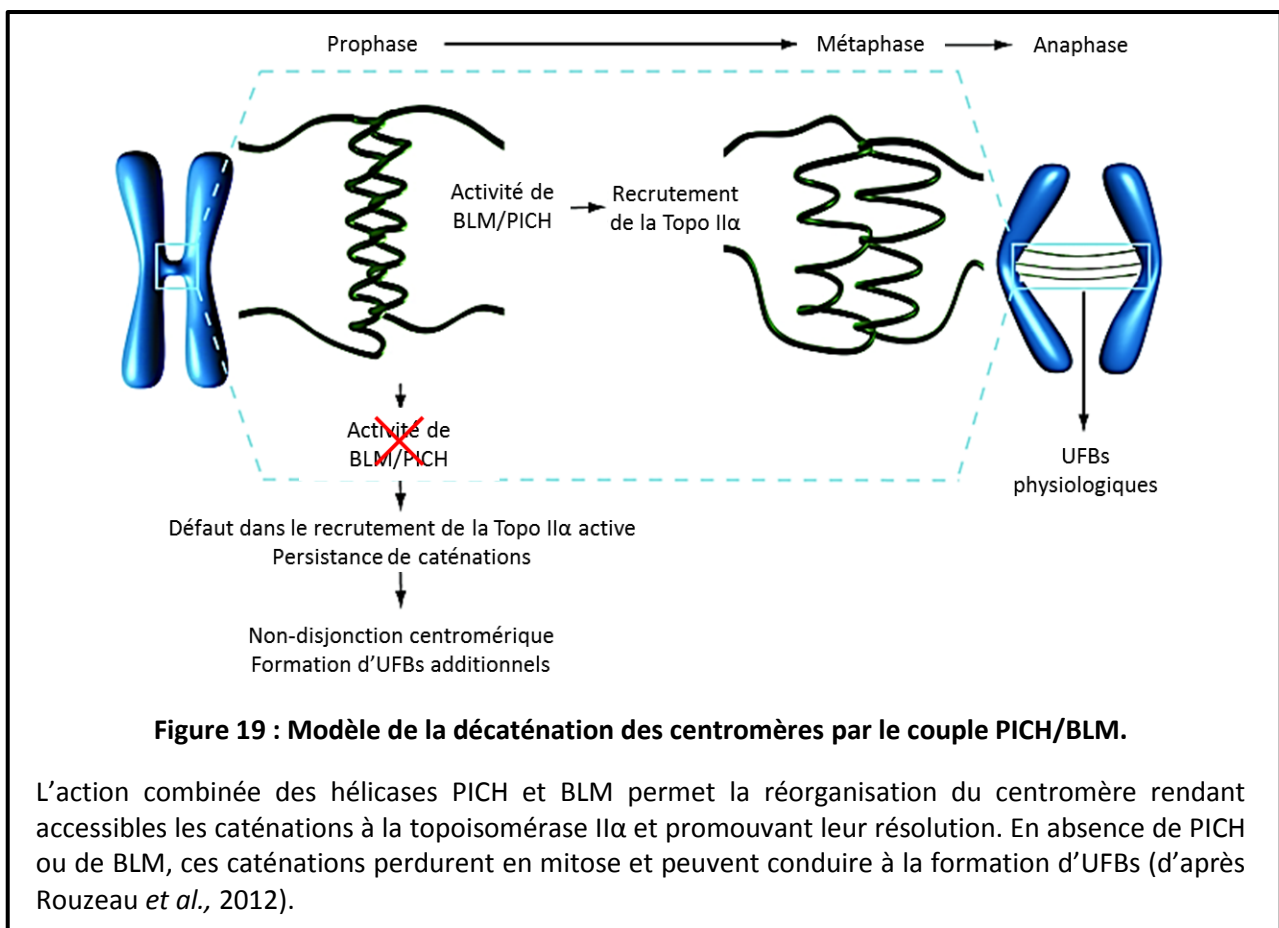
Les centromères représentent un locus chromosomique bien particulier correspondant à la constriction primaire du chromosome et jouent un rôle essentiel pendant la ségrégation des chromatides sœurs au cours de la mitose (pour revue : Plohl *et al.*, 2014).

Une étude récente menée au laboratoire, et à laquelle j'ai participé, a identifié une nouvelle localisation et une nouvelle fonction de BLM pendant la mitose. Nous avons ainsi montré par immunofluorescence, que BLM est recrutée au niveau des centromères dès la phase G2 et y perdure jusqu'en mitose où elle va agir en coopération avec la protéine PICH pour maintenir l'intégrité du centromère (Rouzeau *et al.*, 2012).

L'analyse du centromère par microscopie électronique et par FISH (« *fluorescence in situ hybridization* ») a effectivement permis de constater que l'absence de BLM ou de PICH conduit à une diminution du volume des centromères. En outre, des expériences d'immunoprécipitation de la

chromatine (ChIP) ont montré que la localisation de BLM aux centromères est importante pour favoriser le recrutement de la Topo II α active aux niveaux des séquences centromériques. Enfin, des étalements chromosomiques dans des cellules n'exprimant pas BLM ou PICH ont révélé, en absence de la cohésine, des défauts de disjonctions des centromères en prométaphase (Rouzeau *et al.*, 2012).

D'après ces données, nous avons proposé le modèle suivant : BLM et PICH sont recrutées au niveau du centromère en mitose et de par leurs activités respectives d'hélicase et de remodelage de la chromatine, elles vont modifier la structure des centromères en prométaphase. Ces modifications vont permettre le recrutement optimale de la Topo II α au niveau des caténations centromériques, rendant possible leur résolution avant la séparation des chromatides en anaphase. En absence de BLM, la persistance de ces caténations d'ADN pourrait expliquer les problèmes de disjonctions des centromères ainsi que l'augmentation des UFBs centromériques (Rouzeau *et al.*, 2012) (Figure 19).



3.6.6.3 BLM et anomalies mitotiques

En mitose, BLM est également associée à certaines structures anormales. Ainsi, BLM est recrutée sur les ponts anaphasiques et sur plus de la moitié des chromosomes retardés pouvant apparaître dans les cellules (Chan *et al.*, 2007). Par ailleurs, la déficience en BLM conduit à une accumulation de

ces anomalies mitotiques alors que la réexpression d'une protéine BLM fonctionnelle dans des cellules BS permet de prévenir leur apparition (Chan *et al.*, 2007 ; Chan *et al.*, 2009). Ces données et la fonction hélicase de BLM, laissent envisager qu'au cours de la mitose, BLM est recrutée sur les ponts anaphasiques pour permettre leur résolution et favoriser la ségrégation correcte des chromosomes (Chan *et al.*, 2007, Liu *et al.*, 2014). *Cet aspect sera détaillé et discuté dans la section « Présentation du projet de recherche » p.161.*

BLM est donc une protéine possédant un large éventail de fonctions dans la cellule et agissant à l'interface entre réparation, réplication et mitose. Ses activités pro- et anti-recombinogènes, ainsi que sa capacité à réguler la résection de l'ADN, vont lui permettre de moduler la réparation des CDBs de l'ADN. Elle va également contribuer à la fidélité de la réplication et de la ségrégation des chromosomes de par ses activités de résolution de structures secondaires de l'ADN, de redémarrage de fourches de réplication bloquées et potentiellement de résolution de ponts anaphasiques.

Dans le but d'approfondir les fonctions potentielles de BLM dans la cellule et de mieux comprendre certains aspects du phénotype BS, une signature transcriptomique de la réponse cellulaire à l'absence de BLM a été établie au laboratoire.

4. Signature transcriptomique de l'absence de BLM

Un parallèle a été fait au laboratoire entre le phénotype des cellules BS et le phénotype de bactéries présentant une activation constitutive du système SOS, du fait notamment de caractéristiques similaires. Une étude transcriptomique a ainsi été initiée afin d'identifier et de caractériser les gènes dont l'expression est dérégulée en absence de BLM, qui pourraient refléter l'équivalent d'une réponse SOS (« *SOS-like* ») dans les cellules de mammifères.

4.1 L'hypothèse « *SOS-like* »

La réponse SOS est un processus décrit chez *E. Coli* permettant de stimuler la réparation de l'ADN lorsque celui-ci subit des dommages très délétères ou lorsque la progression de la fourche de réplication est bloquée (Radman, 1975 ; pour revue : Baharoglu et Mazel, 2014). Le SOS bactérien est

une réponse adaptative qui se caractérise par l'induction d'une quarantaine de gènes codant principalement pour des protéines impliquées dans le cycle cellulaire, la réparation et la réplication de l'ADN. Cette réponse permet de « transformer » le génome bactérien très rapidement afin de permettre à la cellule de s'adapter et donc de survivre en condition de stress.

La réponse SOS va être activée lorsque la cellule détecte la présence d'une quantité anormalement élevée de région d'ADNsb. Ce signal d'alarme génotoxique entraîne l'activation de la recombinaise bactérienne RecA (homologue de RAD51 chez l'homme) qui va faciliter le clivage du répresseur LexA conduisant à la dé-répression des gènes de la réponse SOS. Ces gènes, parmi lesquels on retrouve notamment des polymérases infidèles, vont permettre de réparer rapidement les lésions, de ré-initier les fourches de réplication bloquées et de relancer la réplication. Ce mécanisme permet ainsi la survie des cellules en condition de stress au détriment de la fidélité de la réplication et de la réparation (Radman, 1975 ; Walker, 1995 ; Radman *et al.*, 2000 ; Cox, 2003 ; Janion 2008, pour revue : Baharoglu et Mazel, 2014).

Le SOS bactérien est certes une réponse puissante et transitoire à un stress génotoxique mais il s'agit aussi d'un mécanisme induisant un phénotype hyper-recombinogène et mutateur, phénotype caractéristique des cellules BS. De plus, il existe des mutations telles que celle de l'hélicase RecG qui conduit à une activation constitutive du SOS bactérien (Michel *et al.*, 2001). RecG est une hélicase bactérienne qui catalyse la régression de fourches de réplication ainsi que la migration inverse de fourche de réplication ayant régressé (pour revues : Kogoma, 1997 ; Kreuzer, 2005). Or, dans les cellules humaines, ces fonctions sont remplies par BLM.

Etant donné les similarités existant entre le phénotype Bloom et le phénotype des bactéries présentant une réponse SOS constitutive, mais également du fait des similarités de fonction de BLM et RecG, il a été proposé que les cellules BS pouvaient avoir une réponse constitutive de type SOS bactérien : la réponse « *SOS-like* » (pour revue : Amor-Guérét, 2006). Cette réponse permettrait aux cellules BS d'échapper à la mort apoptotique par une voie alternative de réplication dépendante de la RH et médiée par RAD51. Le taux élevé de SCEs serait alors un reflet de cette voie (Amor-Guérét, 2006). Une telle réponse pourrait contribuer au processus de transformation tumorale, en permettant à des cellules ayant échappé à la mort cellulaire de survivre. Selon cette hypothèse, les cellules BS seraient donc dans un état pré-tumoral. Des données ultérieures l'ont conforté, montrant que les cellules BS présentent une activation constitutive de la voie γ H2AX-Chk2-ATM, marqueurs de CDBs (Rao *et al.*, 2007). Or, cette voie est également activée dans des cellules pré-tumorales de différents tissus et en réponse à un stress de réplication (Bartkova *et al.*, 2005 ; Gorgoulis *et al.*, 2005).

C'est donc pour caractériser une éventuelle réponse « *SOS-like* » dans les cellules BS, qui pourrait refléter un état pré-tumoral, qu'une étude transcriptomique a été initiée.

4.2 Profil d'expression des gènes en absence d'une protéine BLM fonctionnelle

Nous disposons au laboratoire de plusieurs modèles pour l'étude du syndrome de Bloom. L'un de ces modèles est une lignée de fibroblastes de peau issus de patients Bloom (GM08505B) et immortalisée avec le virus SV40. Cette lignée n'exprime pas de protéine BLM et est très utilisée dans les laboratoires qui étudient le syndrome de Bloom. En exprimant de manière stable une protéine BLM fonctionnelle dans cette lignée nous avons pu établir une lignée BS complémentée, créant ainsi un couple de lignées isogéniques exprimant ou non BLM. Selon l'approche inverse, la déplétion stable de BLM dans des lignées tumorales HeLa, possédant une expression endogène de BLM, a permis d'établir un autre couple de lignées isogéniques exprimant ou non BLM (Lahkim Bennani-Belhaj *et al.*, 2010).

D'un point de vue technique, la technologie des puces *Affimetrix™* a été utilisée afin de comparer l'expression des ARNm des lignées exprimant ou non BLM. Les deux couples de lignées isogéniques ont ensuite été comparés l'un par rapport à l'autre afin de mettre en évidence une réponse globale à l'absence de BLM et de s'affranchir d'évènements dépendants de la lignée cellulaire.

Cette étude transcriptomique a permis d'identifier 77 gènes qui présentent une expression dérégulée en absence de BLM de manière similaire dans les deux systèmes cellulaires (Tableau 3) (Chabosseau *et al.*, 2011). Parmi ces gènes, on ne retrouve pas de gènes classiques de la réponse SOS bactérienne tels que des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN ou la réplication. Ces résultats suggèrent que les cellules BS pourraient ne pas présenter de réponse « *SOS-like* » ou bien que celle-ci diffère de la réponse classique observée chez la bactérie (*cette question sera approfondie dans la partie « Discussion »*).

Néanmoins, un gène a attiré l'attention de l'équipe du fait de son implication dans la voie de synthèse des nucléotides : il s'agit de la cytidine désaminase (CDA) dont l'expression est drastiquement diminuée en absence de BLM (Chabosseau *et al.*, 2011).

ID du gène	Nom du gène	Niveau de dérégulation du gène		ID du gène	Nom du gène	Niveau de dérégulation du gène
BC031695	DPCD	-		NM_022781	RNF38	+
BC031695	RPS24	-		NM_025080	ASRGL1	+
NM_002961	S100A4	-		NM_018465	C9orf46	+
NM_006379	SEMA3C	-		AL136980	KIAA1815	+
NM_004221	IL32	-		J05008	EDN1	+
AW269335	LPAR1	-		AU152178	ANTXR2	+
NM_000314	PTEN	-		NM_020734	RIMKLB	+
U88879	TLR3	-		NM_152392	AHSA2	+
AF035776	OLR1	-		BE500942	AJ420491	+
BC005844	BDH	-		AI857685	MYH11	+
M69039	RIP	-		AI734993	OACT1	+
NM_000064	C3	-		AW731710	HINT3	+
NM_025139	ARMC9	-		NM_018255	STATIP1	+
NM_005241	MECOM	-		AI671885	Hs.187946	+
W87634	APOOL	-		BE740761	Hs.591790	+
AW051349	CDK6	-		AB011142	USP34	+
AA876372	SLC7A2	-		BE620374	OGFRL1	+
AJ271326	UNC93B1	-		NM_000104	CYP1B1	+
UNC93B1	TYSND1	-		NM_000850	GSTM4	+
NM_001850	COL8A1	-		MGI:98724	TGFA	+
NM_024514	CYP2R1	-		NM_006207	PDGFRL	+
BF968097	Hs.594773	-		NM_002193	INHBB	+
BF968097	TWIST2	-		NM_001941	DSC3	+
AA863228	LOC728855	-		NM_003536	HIST1H3H	+
AA333161	VTI1A	-		NM_003543	HIST1H4H	+
AB017915	CHST3	-		NM_003522	HIST1H2BF	+
BF340228	IGFBP3	-		NM_003523	HIST1H2BE	+
BF059512	DNER	--		NM_017445	H2BFS	+
NM_033317	ZD52F10	--		BC000893	HIST1H2BK	+
AI654224	ALDH1L2	--		NM_212476	FN1	+
NM_007361	NID2	--		NM_003879	CFLAR	+
NM_001785	CDA	--		AL031781	QKI	+
AB018283	RHOBTB1	--		W68084	EGFL5	+
NM_000057	BLM	---		AB028951	CDK11	+
				AB007928	OTUD3	+
				NM_003530	HIST1H3D	+
				NM_001955	EDN1	+
				BE973687	HES1	+
				NM_004817	TJP2	+
				NM_024896	ERMP1	+
				BE973687	HES1	++
				NM_005907	MAN1A1	++
				AF093097	EIF2C1	++

Tableau 3 : Listes des gènes dont l'expression est dérégulée en l'absence d'une protéine BLM fonctionnelle. (d'après Chabosseau *et al.*, 2011)

Sur la base de cette observation, l'équipe a d'abord confirmé que la déplétion en protéine BLM conduit à une diminution de l'expression de la CDA dans plusieurs modèles cellulaires différents. Dans le contexte du syndrome de Bloom, il a été montré que la réexpression d'une protéine BLM fonctionnelle dans des cellules BS permet de restaurer l'expression de la CDA. Puis, un déséquilibre du pool de pyrimidines dans les cellules BS, résultant de la sous-expression de la CDA, a été identifié

et montré comme étant à l'origine d'une partie de l'augmentation du taux de SCEs, et entièrement responsable du ralentissement de la vitesse de progression des fourches de réplication (Chabosseau *et al.*, 2011). Ainsi, l'équipe a décrit pour la première fois qu'une partie du phénotype cellulaire caractéristique du syndrome de Bloom n'est pas directement associée à l'activité hélicase de BLM par elle-même mais a pour origine un déséquilibre du pool de nucléotides (Chabosseau *et al.*, 2011).

Enfin, la chute de l'expression de la CDA en absence de BLM a récemment été confirmée par une vaste étude dans laquelle les profils d'expression des gènes de 16 lignées dérivées de patients BS et de 15 lignées contrôles ont été comparés (Nguyen *et al.*, 2014).

Depuis la mise en évidence de la perte d'expression de la CDA dans les lignées BS et de son implication dans certains aspects du phénotype Bloom, celle-ci fait l'objet d'études majeures au sein de l'équipe. Pour cette raison, le chapitre suivant sera dédié aux liens existants entre pool de nucléotides, CDA et instabilité génétique.

2

Pool de nucléotides, cytidine désaminase (CDA) et instabilité génétique

Les nucléotides constituent les éléments de base de l'ADN. Ainsi, la concentration de chacun des quatre désoxyribonucléotides 5'-triphosphates (dNTPs) aux sites de réplication est critique pour déterminer la fidélité de la réplication et donc le taux spontané de mutations. Un dérèglement des mécanismes de régulation du métabolisme des nucléotides affecte donc la réplication mais également le cycle cellulaire, les fonctions mitochondriales ou encore la défense contre les infections virales (pour revue : Mathews, 2014). La cytidine désaminase (CDA) est une enzyme du métabolisme des pyrimidines catalysant la désamination de la cytidine/désoxycytidine en uridine/désoxyuridine (Nygaard, 1986). Son expression est drastiquement diminuée dans les cellules BS ce qui conduit à un déséquilibre du pool de pyrimidines favorisant l'instabilité génétique (Chabosseau *et al.*, 2011). Ce second chapitre sera dédié au métabolisme du pool de nucléotides, puis à la CDA et à ses fonctions cellulaires.

1. Métabolisme et régulation du pool de nucléotides

Les nucléotides sont nécessaires pour une grande variété de processus biologiques et sont constamment synthétisés *de novo* dans les cellules. Lorsque les cellules prolifèrent, une augmentation de cette synthèse est nécessaire pour permettre la réplication de l'ADN, la production d'ARN et pour soutenir la synthèse de protéines. Les voies de synthèse des nucléotides constituent des voies métaboliques complexes régulées à de nombreux niveaux (pour revue : Lane et Fan, 2015).

1.1 Base azotées, nucléosides et nucléotides

Les structures chimiques des différentes molécules évoquées dans ce paragraphe sont illustrées en figure 20. Les bases azotées sont au nombre de six et séparées en deux grands groupes : les purines et les pyrimidines. Les bases puriques sont l'adénine, la guanine et l'hypoxanthine ; les bases pyrimidiques sont la cytosine, l'uracile et la thymine. L'association d'une de ces bases azotées avec un sucre constitue un nucléoside. Les bases azotées peuvent s'associer avec un ribose, on parlera alors de ribonucléosides : adénosine (A), guanosine (G), cytidine (C), uridine (U), ribothymidine (rare) et inosine (hypoxanthine + ribose). Si la base azotée s'associe avec un désoxyribose on parlera alors de désoxyribonucléoside : désoxyadénosine (dA), désoxyguanosine (dG), désoxycytidine (dC), désoxyuridine (dU) et thymidine (T ou dT).

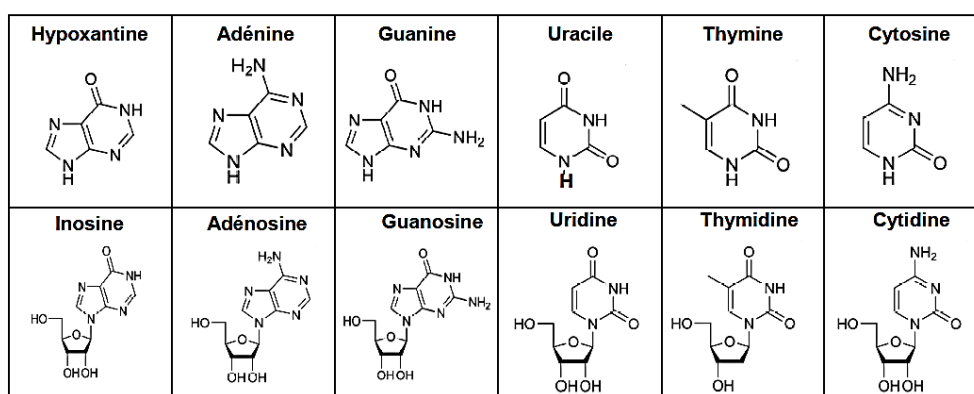


Figure 20 : Structure chimique des bases azotées et des nucléosides associés.

Les bases azotées sont représentées dans la ligne du haut, les nucléosides correspondants sont présentés dans la ligne du bas.

Le nucléotide, élément de base de l'ADN, est constitué d'un nucléoside associé à un, deux ou trois phosphates via le groupement $-OH$ en 5' du ribose. On parlera alors de nucléotide monophosphaté (NMP), diphosphaté (NDP), ou triphosphaté (NTP) (Figure 21). Les NTPs vont servir

de substrats à la polymérase qui va catalyser le clivage de deux phosphates au cours de leur intégration dans l'ADN. Il existe ainsi quatre désoxynucléotides monophosphates retrouvés dans l'ADN : la désoxyadénosine monophosphate (dAMP), la désoxycytidine monophosphate (dCMP), la désoxyguanosine monophosphate (dGMP) et la thymidine monophosphate (TMP). L'intégration des nucléotides dans l'ADN se fait via le phosphate présent en 5' du désoxyribose qui se lie alors au groupement –OH en 3' du nucléotide suivant.

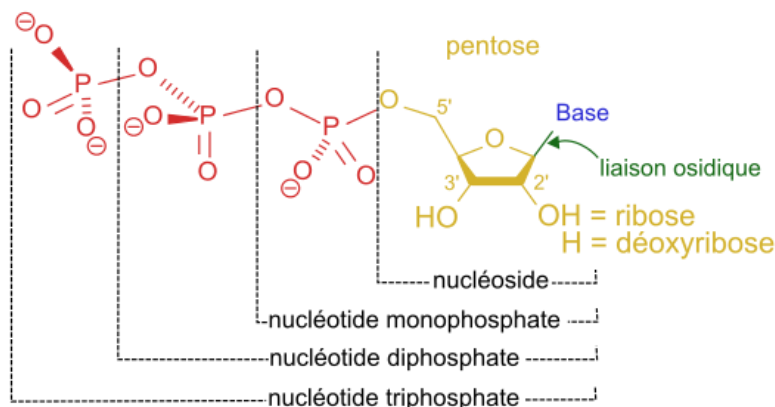


Figure 21 : Structure d'un nucléotide.

La base azotée est représentée en bleu et sa liaison avec l'ose en vert, l'ose est représenté en jaune et les différents phosphates (mono- ; di- ; ou tri-) sont représentés en rouge.

Les nucléotides constituent les éléments de base du génome et sont donc d'une importance capitale pour la cellule. Afin d'assurer une synthèse adéquate de nucléotides, il existe deux principales voies : la voie *de novo* qui permet la synthèse de macromolécules à partir de molécules simples et la voie de « sauvetage » ou de « recyclage » qui permet de catalyser les modifications de nucléosides en dehors de la voie *de novo*.

Ces voies sont présentées en détails dans les annexes, section « voies de synthèse des nucléotides » p.275 à 282.

1.2 La voie de synthèse *de novo*

La synthèse *de novo* constitue une voie de synthèse coûteuse en énergie. La voie des purines repose sur la synthèse en 11 étapes purement cytoplasmiques de l'IMP (« *inosine mono-phosphate* ») à partir de PRPP (« *ribose-5-phosphoribosepyrophosphate* ») et de petits métabolites. L'IMP servira ensuite de base pour la synthèse de la GMP et de l'AMP conduisant finalement à la synthèse de la dATP et de la dGTP (① de la figure 22). Pour les pyrimidines, la voie *de novo* commence par la

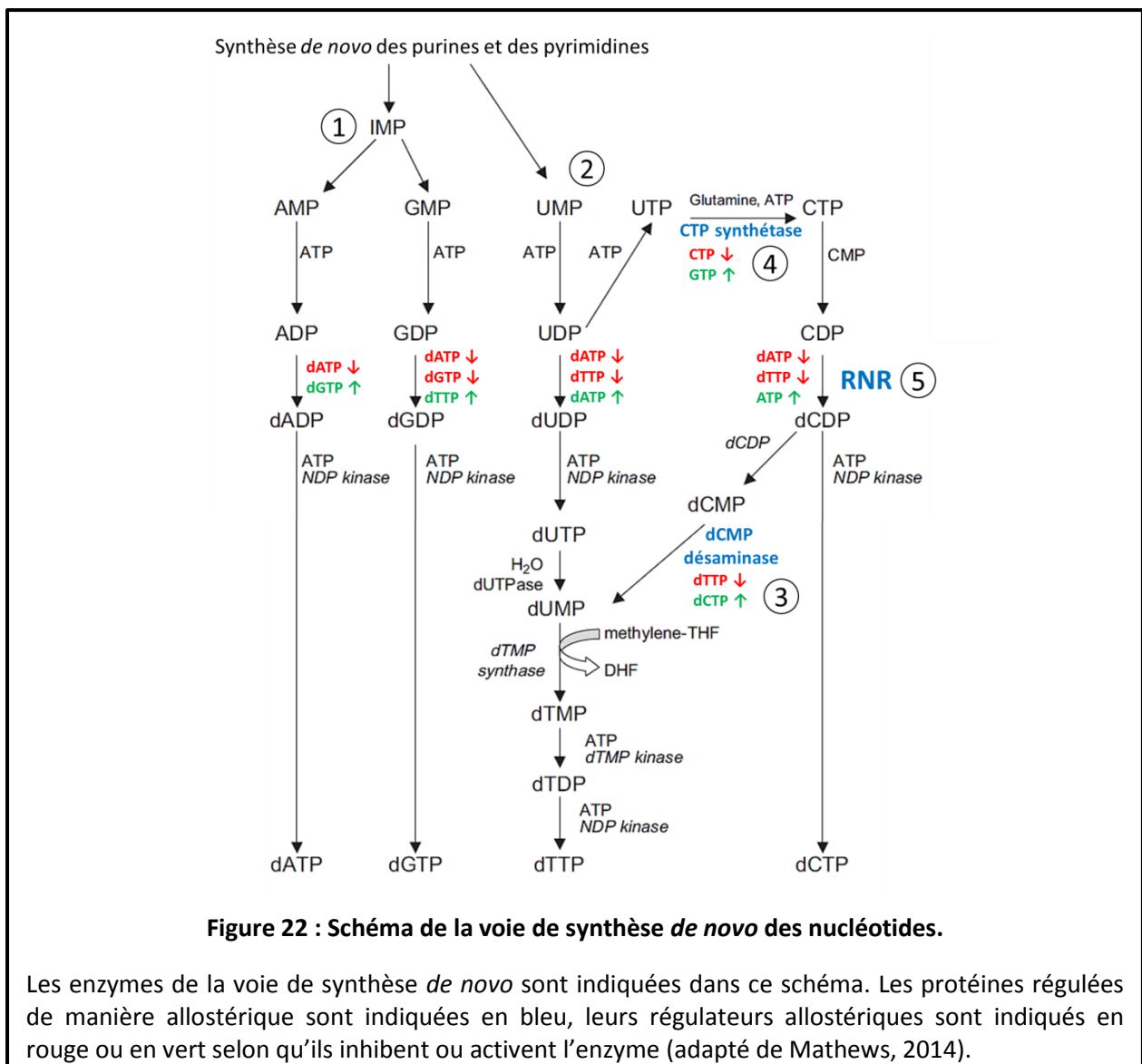
synthèse de l'UMP à partir de la L-glutamine grâce à six réactions, dont une localisée dans la mitochondrie. L'UMP servira ensuite de base pour la synthèse de la dTTP et de la dCTP (② de la figure 22).

Dans ces voies métaboliques, certaines enzymes sont considérées comme limitantes pour la biosynthèse des nucléotides : la PPAT (« *phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase* »), la GART (« *phosphoribosylglycinamide formyltransferase* ») et la MTHFD1 (« *methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1* ») pour la voie de synthèse des purines et la CPSII (« *carbamoyl phosphate synthase II* »), l'ATCase (« *aspartate transcarbamoylase* »), la CAD (« *dihydroorotase trifunctional enzyme* ») et enfin l'UMPS (« *UMP synthase* ») pour la voie de synthèse des pyrimidines (Papin *et al.*, 2003 ; Poulou *et al.*, 2012 ; Kohen *et al.*, 1983). Il est intéressant de noter que certaines étapes sont communes aux purines et pyrimidines. Ainsi, la réduction des ribonucléotides diphosphates (NDP) et triphosphates (NTP) est effectuée par une seule et même enzyme : la ribonucléotide réductase (RNR). De la même manière, la phosphorylation de tous les désoxyribonucléotides diphosphates (dNDP) est catalysée par une seule enzyme, la NDP kinase. Par contre, chaque ribonucléotide monophosphate (NMP) est phosphorylé par une kinase qui lui est propre (pour revue : Kunz *et al.*, 1994).

La synthèse des nucléotides est notamment régulée par la concentration en nucléotides. Ainsi, trois enzymes de la voie de biosynthèse *de novo* sont régulées de manière allostérique, c'est-à-dire que la fixation d'une molécule sur un site conduit à la modification de la fixation d'une autre molécule sur un autre site. Ces trois enzymes sont ① la dCMP désaminase, ② la CTP synthétase et ③ la RNR (en bleu, figure 22), leurs régulateurs allostériques sont représentés en fonction de leurs activités inhibitrice (en rouge) ou activatrice (en vert) (Figure 22).

① La dCMP désaminase catalyse la désamination de la dCMP en dUMP (③ de la figure 22). L'enzyme est présente *in vivo* sous la forme d'un homotétramère et son action nécessite la présence de zinc comme cofacteur. Elle est activée de manière allostérique par la dCTP et inhibée par la dTTP, ce qui permet de réguler le ratio cellulaire dCTP/dTTP (Maley et Maley, 1990 ; Maley *et al.*, 1993). Ce ratio est crucial dans le maintien de la stabilité du génome. En effet un déséquilibre dans un sens ou dans l'autre induit de la mutagénèse (pour revues : Reichard, 1988 ; Kunz *et al.*, 1994).

② La CTP synthétase catalyse la formation de la CTP à partir d'UTP avec la désamination concomitante de la glutamine en glutamate (④ de la figure 22). L'activité de cette enzyme est inhibée par la présence de dCTP ou stimulée par la présence de dGTP (van Kuilenburg *et al.*, 2000). Elle joue également un rôle essentiel dans le ratio dCTP/dTTP.



③ La RNR est au cœur de la synthèse finale des précurseurs de l'ADN puisqu'elle catalyse la réduction de tous les NDPs en dNDPs (⑤ de la figure 22) affectant de ce fait l'ensemble du pool de nucléotides. La RNR détermine ainsi largement la concentration et le ratio des dNTPs, des facteurs critiques pour assurer la fidélité de la réplication (Bebenek *et al.*, 1992 ; Chabes *et al.*, 2003a ; Gon *et al.*, 2011 ; Holmberg *et al.*, 2005 ; Mathews, 2006 ; Moss *et al.*, 2010). La RNR est un tétramère hétérodimérique constituée d'une grande sous-unité RNR1 comprenant deux polypeptides R1 et d'une petite sous-unité RNR2 constituée également de deux polypeptides existant sous deux isoformes R2 et p53R2. L'association de RNR1 et de RNR2 est essentielle pour l'activité de la RNR (pour revue : Guarino *et al.*, 2014). La RNR est régulée allostériquement par différentes molécules affectant son activité et la reconnaissance de substrats (pour revues : Uhlin et Eklund, 1994 ; van Kuilenburg *et al.*, 2000 ; Reichard *et al.*, 2010) (⑤ de la figure 22).

1.3 La voie de « sauvetage » ou de « recyclage »

La voie de « sauvetage » ou voie de « recyclage » permet le recyclage de certains métabolites et de produits de dégradation de l'ADN et de l'ARN afin de produire de nouveaux ribonucléosides ou désoxyribonucléosides selon des réactions moins coûteuses en énergie que la voie *de novo*. La voie de « sauvetage », majoritaire en condition normale, n'est donc pas une voie de secours mais une voie permettant le recyclage à moindre coût des nucléosides, notamment via des réactions médiées par des phosphorylases et des phosphoribosyltransférases.

Comme pour la voie *de novo*, certaines étapes de la voie de « sauvetage » sont limitantes, notamment celles catalysées par la désoxynucléoside kinase, la TK1 (« *thymidine kinase 1* ») et la dCK (« *deoxycytidine kinase* ») dans le cytoplasme et la TK2 (« *thymidine kinase 2* ») et la dGK (« *deoxyguanosine kinase* ») dans la mitochondrie (Eriksson *et al.*, 2002). Mise à part la TK1 dont l'expression est régulée au cours du cycle cellulaire, les autres enzymes de cette voie sont exprimées de manière constitutive même si leur activité peut parfois être influencée par le statut prolifératif (Leanza *et al.*, 2008 ; Rampazzo *et al.*, 2007).

Parmi les enzymes de la voie de « sauvetage » des pyrimidines, la cytidine désaminase (CDA) fait l'objet d'une grande attention au laboratoire. Elle catalyse la désamination de la cytidine et de la désoxycytidine respectivement en uridine et désoxyuridine (Nygaard, 1986). Etant donné le rôle central de la CDA dans mon projet de thèse, celle-ci sera plus amplement décrite dans une section indépendante à la fin de ce chapitre.

La voie de « sauvetage » regroupe également les réactions permettant de métaboliser les nucléosides ou analogues de nucléosides présents dans le milieu extracellulaire afin de les utiliser entre autres pour la synthèse de l'ADN (Jordheim *et al.*, 2013). L'import des nucléosides du milieu extracellulaire est effectué par deux familles de récepteurs : ❶ la famille SLC29 (« *solute carrier 29* ») codant pour des transporteurs de nucléosides équilibratifs (ENTs, « *equilibrative nucleoside transporters* ») et ❷ la famille SLC28 (« *solute carrier 28* ») codant pour des transporteurs de nucléosides concentratifs (CNTs, « *concentrative nucleoside transporters* »).

❶ Les ENTs sont des protéines qui facilitent la diffusion des nucléosides à travers les membranes cellulaires. Elles vont ainsi permettre le passage des nucléosides depuis le milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire et inversement, et ce de manière dépendante de la concentration en substrat. Cette famille comprend quatre membres chez les mammifères : ENT1 à ENT4. ENT3 et ENT4 n'ont pas encore de fonctions bien définies, alors que ENT1 et 2 sont bien caractérisées. Ces dernières permettent le transport de nucléosides avec les mêmes spécificités de

substrats pour les nucléosides puriques et pyrimidiques. Il est important de noter que ENT2 est également capable de favoriser le transport de bases puriques ou pyrimidiques (Tableau 4) (pour revues : Kong *et al.*, 2004 ; Baldwin *et al.*, 2004).

Transporteurs	Dépendance au sodium	Substrats	Substrats préférentiels	Exemples d'analogues de nucléosides transportés
ENT1	Non	Nucléosides : Adénosine Guanosine Inosine Uridine Thymidine Cytidine	Tous les substrats	5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) Cytarabine (Ara-C) Gemcitabine
ENT2	Non	Nucléosides : Adénosine Guanosine Inosine Uridine Thymidine Cytidine Nucléobases : Adénine Guanine Hypoxanthine Uracile Thymine Cytosine	Tous les substrats	5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) Cytarabine (Ara-C) Gemcitabine
CNT1	Oui	Nucléosides : Adénosine Uridine Thymidine Cytidine	Nucléosides pyrimidiques	Cytarabine (Ara-C) Gemcitabine
CNT2	Oui	Nucléosides : Adénosine Guanosine Inosine Uridine Thymidine	Nucléosides puriques	5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) 5-Iodo-2'-deoxyuridine (IdU)
CNT3	Oui	Nucléosides : Adénosine Guanosine Inosine Uridine Thymidine Cytidine	Tous les substrats	Gemcitabine

Tableau 4 : Caractéristiques des transporteurs de nucléosides ENTs et CNTs (d'après les données de Kong *et al.*, 2004).

② La famille des CNTs est constituée de trois membres, CNT1 à CNT3, dont la capacité de transports des nucléosides est dépendante du sodium (Na^+). Tout comme les ENTs, CNT3 transporte avec la même affinité les nucléosides puriques et pyrimidiques. A l'inverse, CNT1 transporte préférentiellement les nucléosides pyrimidiques alors que CNT2 a une plus grande affinité pour les nucléosides puriques (Tableau 4) (pour revues : Kong *et al.*, 2004 ; Gray *et al.*, 2004).

Etant donné que les analogues de nucléosides ont des structures comparables aux nucléosides classiques, ces deux familles de transporteurs sont également responsables de l'entrée ou de la sortie de beaucoup d'analogues de nucléosides utilisés en chimiothérapie. Leur expression ainsi que leur activité ont donc un impact certain sur la pharmacocinétique, l'efficacité et la toxicité des analogues de nucléosides (pour revue : Kong *et al.*, 2004). *Cet aspect sera détaillé dans la section 2.3.*

1.4 Le catabolisme des nucléotides

Les réactions de dégradation des dNTPs sont primordiales pour réguler la taille du pool de nucléotides (pour revue : Rampazzo *et al.*, 2010). Par exemple, les dNMPs produits par les désoxynucléosides kinases peuvent être reconverties en désoxynucléosides par des 5'-désoxynucléotidases (Bianchi et Spychala, 2003). Les nucléosides phosphorylases constituent également une classe d'enzyme du catabolisme des nucléotides qui entre en compétition avec les désoxynucléosides kinases. Par la dégradation des phosphates des désoxynucléosides, elles inhibent l'action des kinases de la voie de « sauvetage » et limitent l'augmentation du pool de dNTPs. Les pathologies humaines associées à l'inactivation génétique de la thymidine phosphorylase (Nishino *et al.*, 1999) et de certaines phosphorylases des purines (Markert, 1991 ; Arpaia *et al.*, 2000) illustrent l'importance de ces mécanismes de dégradation des nucléotides pour l'homéostasie cellulaire. *Ces pathologies seront détaillées dans la section 3.7.*

La concentration de chaque dNTP résulte donc de leurs niveaux relatifs de production, de consommation et de dégradation.

1.5 Caractéristiques du pool de nucléotides

1.5.1 Taille du pool de nucléotides

Le pool de nucléotides est asymétrique, c'est-à-dire que chaque nucléotide est présent à l'équilibre dans des proportions très différentes. Ce ratio entre les différents dNTPs est maintenu tout au long du cycle cellulaire. L'une des caractéristiques les plus constantes est une sous-représentation du pool de dGTP qui représente environ 5 à 10% du pool de dNTPs total (Mathews et Ji, 1992 ; Buckstein *et al.*, 2008). Par exemple, dans des cellules HeLa synchronisées en phase S, la composition du pool est de : 60μM dATP, 60μM dTTP, 30μM dCTP et 10μM dGTP (Zhang et Mathews, 1995). Il est cependant important de noter que les cellules HeLa, comme toutes les cellules ayant subi une transformation oncogénique, présentent un pool de dNTPs trois à quatre fois

supérieur à celui de cellules normales diploïdes. En outre, ces valeurs peuvent varier en fonction de l'organisme et du type cellulaire (Martomo et Mathews, 2002).

1.5.2 Compartimentation du pool de nucléotides

La localisation de la RNR, ainsi que le lieu de biosynthèse des dNTPs, a longtemps été un sujet de controverse pour les eucaryotes. Les premières études d'immunofluorescences réalisées sur des cellules de mammifères ont proposé que les sous-unités R1 et R2 tout comme la synthèse des dNTPs soient exclusivement cytoplasmiques (Engstrom *et al.*, 1984 ; Engstrom et Rozell, 1988). Une étude récente réalisée dans des fibroblastes humains a ensuite confirmé que la grande majorité des sous-unités R1, R2 et p53R2 de la RNR sont cytoplasmiques et que le processus de réduction des NDPs en dNDPs prend place dans le cytoplasme (Pontarin *et al.*, 2008). Néanmoins, une synthèse exclusivement cytoplasmique paraît contre-intuitive étant donné que les dNTPs sont nécessaires au moment de la réplication, mécanisme purement nucléaire chez les eucaryotes. Par la suite, il a été suggéré que le pool de nucléotides pouvait être compartimenté, cette hypothèse étant soutenue par l'observation d'agrégats contenant des enzymes du métabolisme des dNTPs (Prem veer Reddy et Pardee, 1980). Une théorie selon laquelle le complexe RNR pourrait être couplé directement à la machinerie de réplication, formant ainsi un édifice moléculaire appelé « *replitase* » a été proposée. Dans ce modèle, la concentration de dNTPs aux sites de réplication serait bien plus importante que la concentration globale mesurée. Le « *replitase* » permettrait donc de faire le lien entre la biosynthèse des dNTPs et leur utilisation au cours de la réplication (Guzman *et al.*, 2002 ; Murthy et Reddy, 2006). Cependant, à ce jour aucune preuve formelle n'a permis de démontrer l'existence d'un tel complexe. De plus, les données favorables à l'hypothèse d'une compartimentation ont été obtenues à partir de cellules asynchrones, elles pourraient donc uniquement refléter une compartimentation intercellulaire et non pas intracellulaire (Kunz *et al.*, 1994). Enfin, une étude chez *S. cerevisiae* dans des cellules synchronisées a montré que la synthèse de dNTPs et l'initiation de la réplication sont indépendantes l'une de l'autre (Koc *et al.*, 2003).

Malgré cela, d'autres enzymes de la voie de synthèse des nucléotides pourraient présenter une compartimentation, non pas au niveau de la machinerie de réplication, mais dans le cytoplasme. En effet, l'hypothèse d'un complexe contenant plusieurs enzymes de la voie de synthèse des purines a longtemps été attractive étant donné que la glycine 5-phospho- β -D-ribosylamine (une molécule de cette voie de synthèse) est très instable et nécessite donc une prise en charge rapide par la GART pour donner un composé plus stable. Les premières expériences cherchant à isoler un tel complexe sont restées infructueuses. Cependant, en 2008, l'utilisation de protéines marquées par un fluorochrome a permis d'identifier une co-localisation *in vivo* de six enzymes de la voie de synthèse

des purines (An *et al.*, 2008) formant un complexe appelé « *purinosome* ». Les études concernant les conditions de sa formation sont contradictoires, impliquant la concentration en purines comme élément déclencheur ou non (An *et al.*, 2008, An *et al.*, 2010 ; Zhao *et al.*, 2013, Baresova *et al.*, 2012 ; Field *et al.*, 2011). L'existence du « *purinosome* » est attractive mais reste vivement critiquée notamment du fait de certains résultats opposés et également car sa formation pourrait être lié à un phénomène d'agrégation associé à l'expression de protéines fluorescentes ou à des conditions de stress (pour revue : Zhao *et al.*, 2014).

Il est évident que les données actuelles ne permettent pas d'identifier de manière formelle, à l'état basal, une compartimentation du pool de nucléotides ou des enzymes de synthèse associées. Néanmoins, il n'est pour l'instant pas possible technologiquement de mesurer les nucléotides à une localisation donnée dans la cellule. *La compartimentation du pool reste donc une hypothèse plausible qui sera plus amplement traitée dans la partie « Discussion ».*

1.5.3 Régulation au cours du cycle cellulaire

L'application de la chromatographie liquide à la mesure des niveaux de dNTPs intracellulaires (Chabes *et al.*, 2003) a permis d'étudier les fluctuations fines des quantités de dNTPs au cours du cycle cellulaire. Ainsi, le niveau du pool de nucléotides n'est pas constant. Par exemple, chez les eucaryotes, le pool de dNTPs est au plus bas en G1 et augmente de manière exponentielle à la transition G1/S (Koc *et al.* 2004). Chez *S. cerevisiae*, le niveau de dNTP de phase S augmente jusqu'à atteindre environ neuf fois la concentration de G1 alors que la concentration chez les cellules humaines peut augmenter dix-huit fois par rapport à la valeur initiale (Håkansson *et al.*, 2006).

Cette modification de la taille du pool de nucléotides est associée à un changement de la régulation ❶ transcriptionnelle ou ❷ post-traductionnelle de certaines enzymes clés de la voie de biosynthèse des nucléotides. Ces changements permettent ainsi de moduler le métabolisme des nucléotides en fonction du cycle.

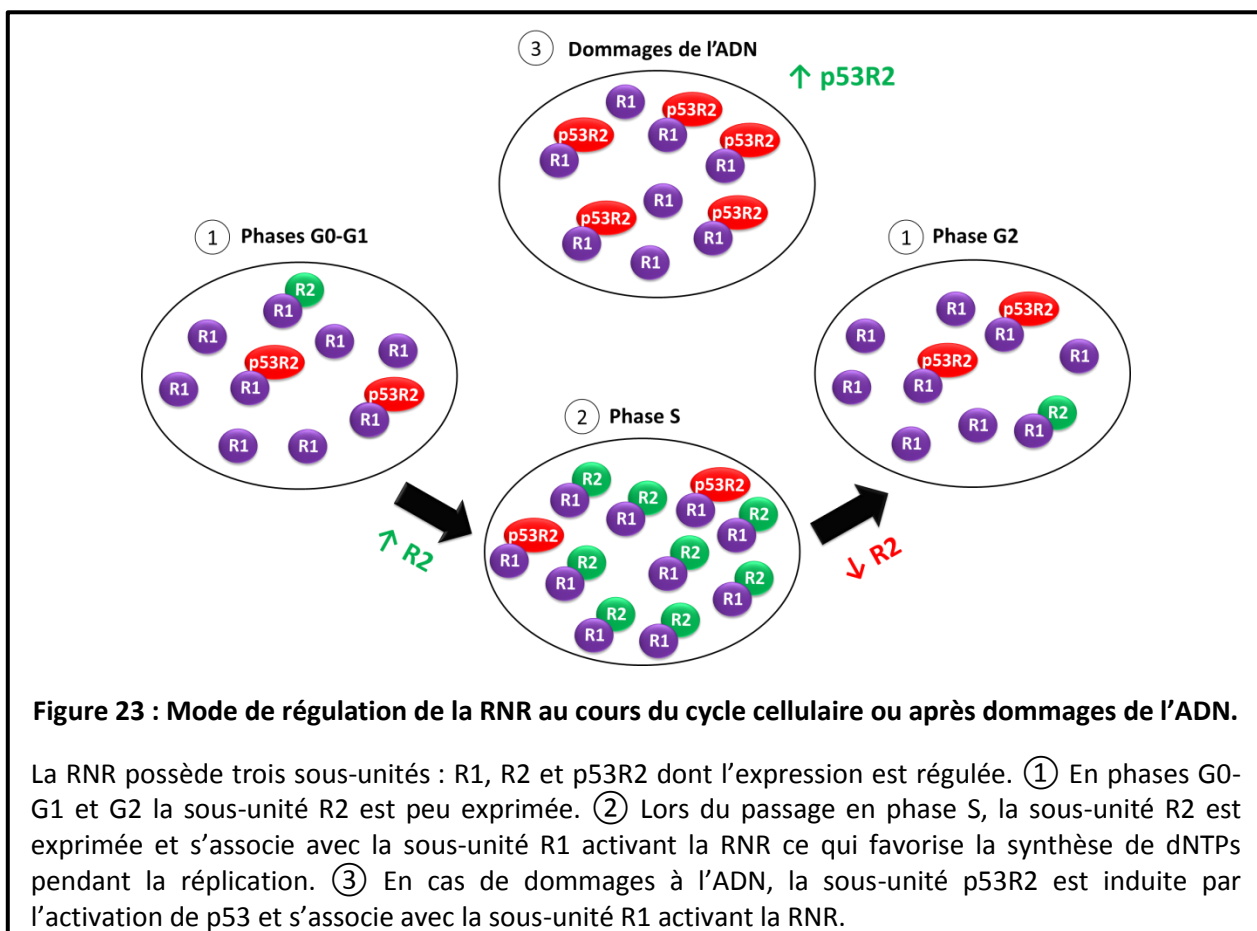
❶ La transition G1/S est une étape synonyme de nombreux changements dans le métabolisme cellulaire. La synthèse de l'ADN qui a lieu en phase S nécessite la stimulation de divers processus cellulaires dépendants des enzymes de réplication ou de réparation de l'ADN mais également des enzymes du métabolisme des nucléotides. Ainsi, chez *S. cerevisiae* plusieurs enzymes clés du métabolisme des dNTPs, dont la dTMP synthase, la dTMP kinase et les sous-unités de la RNR, sont régulées transcriptionnellement durant la transition entre la phase G1 et la phase S. La transcription de ces gènes est contrôlée par une séquence activatrice positionnée en amont du gène : la séquence MCB (« *MluI cell cycle box* ») (Johnston et Lowndes, 1992 ; Merrill *et al.*, 1992 ; McIntoch, 1993).

Plusieurs facteurs de transcription interagissant avec les séquences MCBs ont été identifiés chez *S. cerevisiae*, dont Swi6 et Mpb1, qui interagissent ensemble pour former l'hétérodimère DSC1 qui est lui-même capable de se lier directement à la séquence MCB *in vitro*. Les mutations inactivatrices des gènes *SWI6* et *MPB1* conduisent entre autres à une expression du gène de la dTMP synthétase indépendante du cycle cellulaire suggérant ainsi que le complexe DSC1 agit en tant que répresseur sur les séquences MCBs. L'expression de la dTMP synthétase reste néanmoins dépendante des séquences MCBs ce qui signifie que d'autres facteurs de transcription activent l'expression du gène au cours du cycle cellulaire (Dirick *et al.*, 1992 ; Lowndes *et al.*, 1992 ; Koch *et al.*, 1993). Il est intéressant de noter que tous les gènes n'ont pas une expression dépendante du cycle cellulaire et qu'ils ne sont pas forcément les mêmes d'une espèce à l'autre, notamment entre *S. cerevisiae* et *S. pombe* (McIntosh *et al.*, 1986 ; White *et al.*, 1986 ; Waseem *et al.*, 1992 ; Park *et al.*, 1993).

Dans les organismes supérieurs, certains gènes du métabolisme des dNTPs présentent également une expression variant au cours du cycle cellulaire. Un site homologue de la séquence MCB, reconnu par les facteurs de transcription de la famille des E2Fs est retrouvé en amont de certains de ces gènes, dont ceux codant pour la DHF réductase, la thymidine kinase, la dTMP synthétase et la désoxycytidine kinase. En phase G1, la protéine E2F est liée à la protéine Rb induisant l'inhibition de son activité de facteur de transcription. Lors du passage en phase S, le lien entre les deux protéines est rompu et l'activation de la transcription par E2F devient effective. Ainsi, de nombreux gènes ont une expression régulée par le complexe E2F/Rb (Farnham *et al.*, 1993 ; Ahlander et Bosco, 2009), notamment les gènes du métabolisme des nucléotides évoqués précédemment. En effet, chez la souris, la DHF reductase a été décrite comme étant régulée par E2F alors que chez l'homme une étude a identifié la thymidilate kinase comme étant une cible de E2F (Farnham *et al.*, 1993 ; Li *et al.*, 1993 ; Slansky *et al.*, 1993).

L'activité de la RNR est également affectée lors du cycle cellulaire notamment via la régulation de l'expression de ses sous-unités. En effet, la sous-unité R1 est exprimée de manière relativement constante au cours du cycle cellulaire alors que la sous-unité R2 est principalement exprimée en phase S et est pratiquement absente en G0-G1 et en G2 (① de la figure 23). L'augmentation de la transcription de R2 en phase S conduit à son association avec R1 et à la formation d'une RNR active stimulant la synthèse de nucléotides (② de la figure 23). Il est à noter que l'activation transcriptionnelle de la sous-unité R2 pourrait également être dépendante de E2F chez les mammifères. En effet, la sous-unité R2 de la RNR murine possède un site de régulation par E2F, contrôlant sa régulation cycle-dépendante (Chabes *et al.*, 2004). Enfin, du fait de l'expression restreinte de la sous-unité R2, il a longtemps été supposé que la synthèse de dNTPs était un

processus ayant lieu exclusivement en phase S. Il existe néanmoins une autre sous-unité nommée p53R2 et exprimée de manière assez constante au cours du cycle. L'expression de p53R2 est fortement induite par p53. Elle est donc induite lors de dommages de l'ADN, vraisemblablement pour soutenir la réparation grâce à son association avec R1 ce qui conduit à la formation d'une RNR active (③ de la figure 23). Étonnamment, les dommages de l'ADN et la formation de l'hétérodimère R1/p53R2 n'entraînent cependant pas une augmentation importante du pool de nucléotides chez les mammifères (pour revue : Reichard, 1988). *Ce point sera discuté dans la section suivante.*



② La régulation des enzymes du métabolisme des nucléotides peut également se faire par une régulation post-traductionnelle. Par exemple, l'ARNm de la thymidilate kinase est traduit plus efficacement en phase S, et cette même enzyme est dirigée vers la dégradation protéolytique en phase G1 (Sherley et Kelly, 1988). D'autres protéines peuvent également être directement ciblées pour la dégradation. C'est le cas par exemple de la sous-unité R2 murine qui présente une boîte « KEN » reconnue par le facteur Cdh1. En mitose, celui-ci se lie au complexe APC (« *anaphase-promoting complex* ») qui présente une activité E3 ubiquitine ligase. Celle-ci va ubiquitiner la sous-

unité R2 et induire sa dégradation par le protéasome (Chabes *et al.*, 2003b). Selon un mécanisme similaire, les protéines dTMP kinase et thymidilate synthétase sont elles aussi des cibles du complexe APC (Ke *et al.*, 2005).

La régulation du pool de nucléotides au cours du cycle cellulaire est donc un mécanisme conservé des procaryotes aux eucaryotes. L'intérêt biologique de cette régulation a longtemps été discuté, néanmoins celle-ci pourrait constituer une défense contre les agressions virales. En effet, les dNTPs cellulaires constituent un élément nécessaire à la réplication des virus lors de leur entrée dans la cellule. Ainsi, les virus ne disposeraient que d'un pool de nucléotides limité dans les cellules quiescentes, entravant leur réplication correcte. Certaines données sont en faveur de cette hypothèse. Par exemple, certains virus (SV40, adénovirus, virus oncogéniques, ...) produisent des protéines capables de perturber la régulation de la transcription telles que l'antigène T du SV40 ou la protéine E7 du virus HPV (« *human papilloma virus* »). Celles-ci entraînent la dissociation du complexe Rb/E2F levant ainsi l'inhibition de la transcription des gènes de biosynthèse des dNTPs concernés (pour revue : Kunz *et al.*, 1994).

1.5.4 Régulation lors de dommages à l'ADN

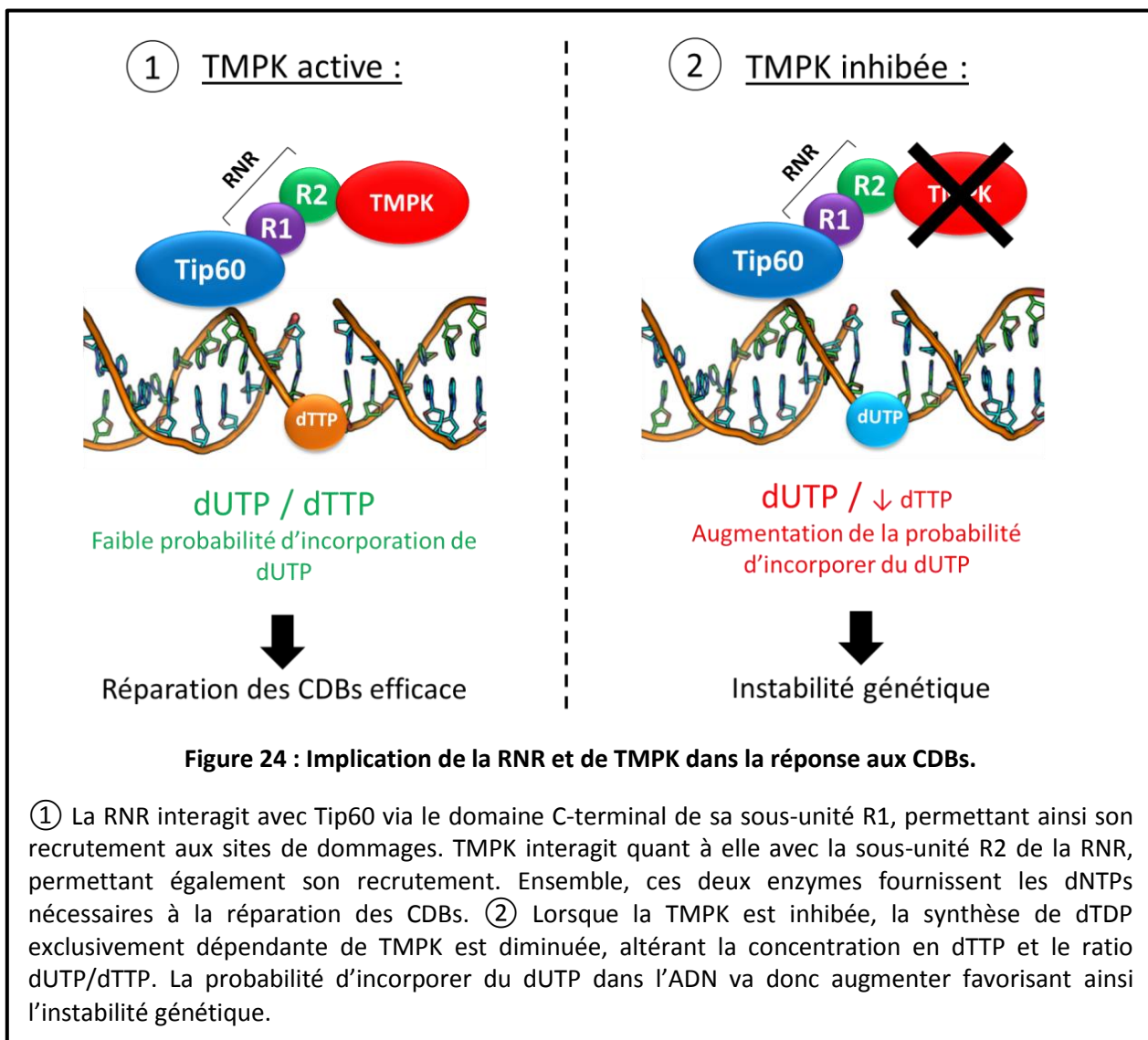
En plus de sa régulation au cours du cycle cellulaire, la synthèse de nucléotides peut être affectée par des dommages de l'ADN. Chez la levure *S. cerevisiae*, le pool de dNTPs est augmenté de façon globale d'un facteur six à huit en réponse à des dommages de l'ADN (Chabes *et al.*, 2003). Cette augmentation est due à de nombreux mécanismes tels que l'expression de gènes de biosynthèse des dNTPs et l'activation de la voie Rad51/Mec1/Dun1 qui induit la levée de l'inhibition de la RNR par Sml1 en dehors de la phase S (Zhao *et al.*, 1998 ; Chabes *et al.*, 1999 ; Zhao *et al.*, 2001 ; Zhao et Rothstein, 2002). Cette augmentation reste cependant contre-intuitive par rapport à la régulation allostérique de la RNR évoquée précédemment. En effet, l'accumulation de dATP devrait inhiber la RNR et donc prévenir l'accumulation des dNTPs (*cf. Figure 22*). Une étude a néanmoins proposé une explication à ce phénomène en montrant que l'inactivation du site allostérique de la RNR dépendant du dATP par mutagenèse dirigée, induit une accumulation des dNTPs lors de dommages de l'ADN. Les auteurs ont donc proposé que lors de l'accumulation de dNTPs, la RNR présenterait une inhibition réduite de son site allostérique par le dATP (Chabes *et al.*, 2003). L'accumulation de dNTPs en réponse aux dommages de l'ADN pourrait permettre d'optimiser et de soutenir la réparation des dommages en fournissant aux enzymes de réparation les dNTPs nécessaires à leur activité.

La réponse du pool de nucléotides après dommages de l'ADN est beaucoup moins claire chez les mammifères. Comme évoqué précédemment, l'expression de la sous-unité p53R2 de la RNR est induite par des traitements endommageant l'ADN tels que des radiations ionisantes, des UVs ou l'adryamycine (Tanaka *et al.*, 2000). Il a ainsi été proposé que l'induction de l'expression de p53R2 et son association avec la sous-unité R1 de la RNR pourraient permettre de stimuler la synthèse de dNTPs après dommages de l'ADN, notamment lorsque l'expression de la sous-unité R2 est très réduite, c'est-à-dire en dehors de la phase S (*cf. Figure 23*). Néanmoins, une étude réalisée sur des cellules humaines et murines a démontré que le pool de dNTPs est très peu augmenté suite à des traitements provoquant des dommages de l'ADN. En effet, l'accumulation de p53R2 est très lente et conduit à une augmentation du pool de dNTPs très faible, de l'ordre d'un facteur 2 dans des cellules en phases G0/G1 dont le pool ne représente que 5% de celui de cellules en phase S (Håkansson *et al.*, 2006). Le rôle de p53R2 reste donc peu compris dans les cellules de mammifères. Il a néanmoins été suggéré que son expression quasi-constante au cours du cycle cellulaire (*cf. Figure 23*) pourrait permettre la production de dNTPs nécessaires à la réparation de l'ADN dans des conditions basales et à la réplication de l'ADN mitochondrial dans les cellules quiescentes (Håkansson *et al.*, 2006 ; Pontarin *et al.*, 2007).

De manière intéressante, des études récentes ont démontré un recrutement de certaines enzymes de la synthèse des nucléotides directement aux sites de dommages de l'ADN. Par exemple, la RNR interagit avec la protéine Tip60 via le domaine C-terminal de la sous-unité R1 permettant ainsi le recrutement de la RNR au niveau des cassures de l'ADN (Niida *et al.*, 2010). Lorsque la RNR n'est plus capable d'être recrutée aux sites de dommages de l'ADN, la réparation des CDBs est affectée en phase G1 mais pas en phase S. Une explication possible à ce résultat est que la concentration basse des nucléotides en G1 rend le recrutement de la RNR aux sites de dommages nécessaires pour fournir les dNTPs aux enzymes de réparation de l'ADN. A l'inverse, la concentration élevée de nucléotides en phase S est suffisante pour palier à la demande lors de dommages de l'ADN et ne nécessite donc pas une production locale directement aux sites de dommages (Niida *et al.*, 2010 ; Hakansson *et al.*, 2006).

La thymidylate kinase (TMPK) est également recrutée aux sites de dommages de manière dépendante de la RNR (Hu *et al.*, 2012). La TMPK possède une fonction unique dans la synthèse des nucléotides. En effet, elle est nécessaire à la synthèse de la dTDP à partir de dTMP ; tous les autres dNDPs, la dUDP incluse, étant directement produits par la RNR. Elle possède également un rôle primordial lors de dommages à l'ADN. Elle est ainsi recrutée aux sites de réparation de l'ADN et son inhibition conduit à l'incorporation de dUTP durant la réparation des CDBs ; ces deux événements

étant dépendants de la RNR. De manière intéressante, l'inhibition de la TMPK dans des cellules déficientes pour la RH n'affecte pas la réparation des CDBs. Les auteurs en ont déduit que l'inhibition de la TMPK réduit la production de dTTP aux sites de dommages, la synthèse de la dTDP étant strictement dépendante de TMPK. La RNR est, quant à elle, toujours capable de promouvoir la synthèse locale de la dUTP. Le ratio dTTP/dUTP ainsi modifié conduirait à l'augmentation de la probabilité d'incorporer de la dUTP dans l'ADN au lieu de la dTTP, particulièrement au moment de la RH (Figure 24) (Hu *et al.*, 2012).



Ces deux exemples d'enzymes de synthèse des nucléotides recrutées directement aux sites de dommages de l'ADN soulèvent à nouveau la question d'une compartimentation du pool de nucléotides. En effet, ces observations suggèrent qu'il existe une concentration locale de nucléotides

aux sites de dommages, plus élevée que la concentration globale, et permettant de fournir les dNTPs nécessaires aux enzymes de réparation de l'ADN.

2. Le pool de nucléotides : une cible en cancérologie

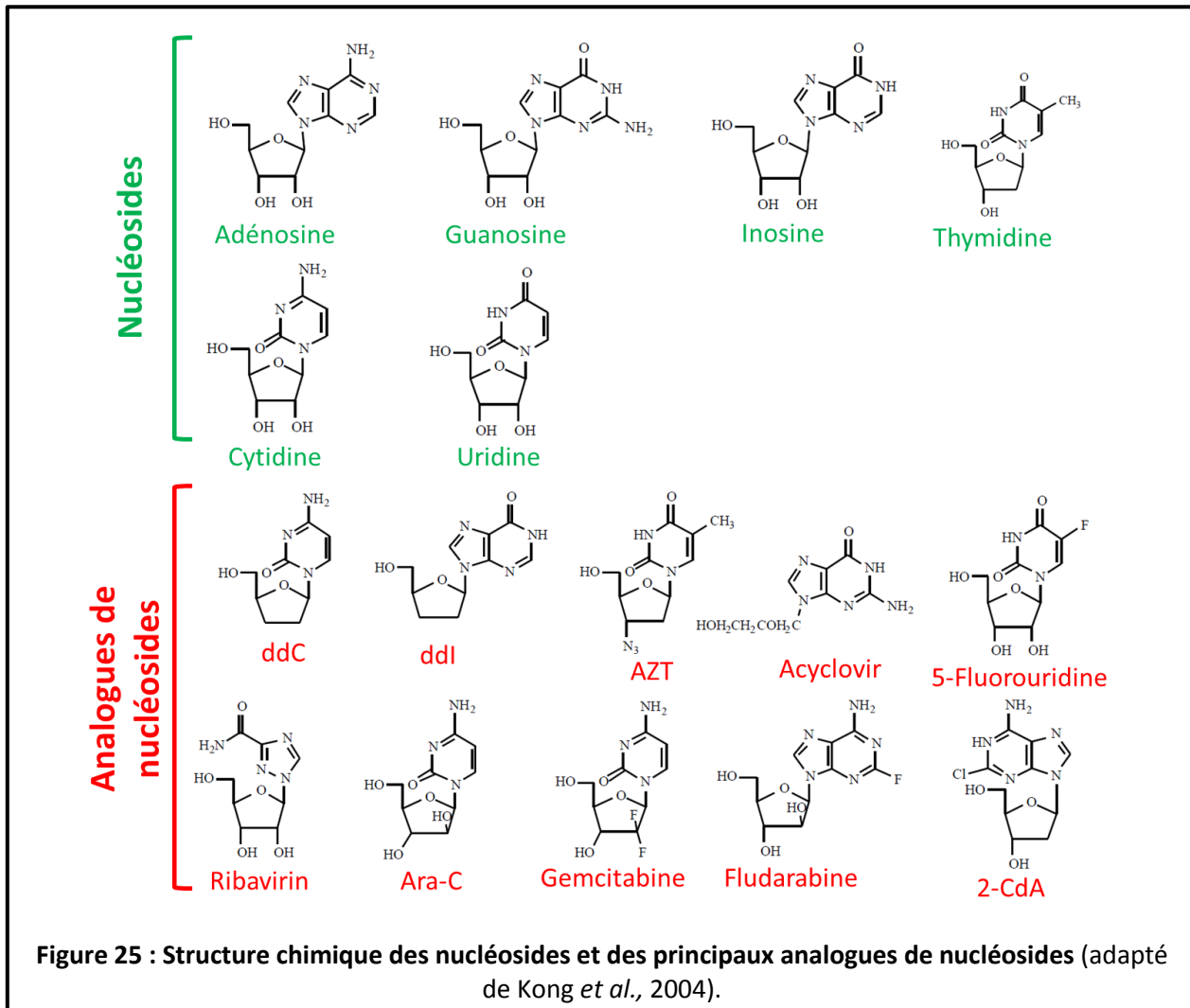
Etant donné son rôle crucial dans le métabolisme cellulaire, le pool de nucléotides représente une bonne cible pour induire la mort cellulaire. Des analogues de nucléosides (ANs) ont donc été développés. Les cellules tumorales ainsi que les virus dépendent fortement de la synthèse des nucléotides. Pour cette raison, les ANs sont utilisés en clinique depuis presque cinquante ans pour le traitement des patients atteints de cancers ou d'infections virales. De plus, la mise sur le marché de nouvelles drogues ces dix dernières années démontre que cette famille de molécules possède toujours un fort potentiel thérapeutique.

2.1 Analogues utilisés en clinique

Les ANs sont des composés synthétiques modifiés chimiquement et développés dans le but de mimer les rôles biologiques des nucléosides et nucléotides. Leur incorporation dans l'ADN et l'ARN conduit à une inhibition de la division cellulaire et de la réplication des virus. En plus de leur capacité à être incorporés dans l'ADN ou l'ARN, les ANs peuvent également interagir et inhiber certaines enzymes telles que des polymérases humaines ou virales, des kinases, la RNR, des DNA méthyltransférases, ou la thymidilate synthétase (Jordheim *et al.*, 2013).

Les analogues les plus utilisés sont les dérivés pyrimidiques AraC (ou cytidine arabinoside) et gemcitabine ainsi que les dérivés puriques fludarabine et cladribine (2-CdA) (Figure 25). L'AraC diffère de la cytidine au niveau du sucre (un arabinoside remplace le ribose). Elle est aujourd'hui essentielle dans le traitement initial des leucémies aigües myéloïdes (AML) où elle permet une réponse complète chez 30% des patients quand elle est utilisée seule et à dose classique. En association avec d'autres molécules ou à fortes doses, elle entraîne des rémissions complètes dans 70% des cas (Stone, 2002). La gemcitabine (2'-désoxy-2',2'-difluorocytidine) se distingue par la présence de deux atomes de fluor sur l'ose. Il s'agit d'un dérivé plus récent qui contrairement à l'AraC, est actif sur les cellules de tumeurs solides *in vitro* et *in vivo* (Milano *et al.*, 2002). Cette molécule est utilisée pour le traitement des cancers de la vessie, du pancréas et du poumon. La fludarabine (ou fluoroadénine arabinoside) est utilisée sous sa forme monophosphorylée en raison de sa faible solubilité. Elle est indiquée en monothérapie ou polythérapie dans le traitement des

leucémies lymphoïdes chroniques (Halleck et Eichhorst, 2004). Enfin, la cladribine (ou chloro-désoxyadénosine) a été développée pour sa résistance à l'adénosine désaminase (ADA) et son index thérapeutique (écart entre concentration active et concentration toxique) favorable. Elle est utilisée dans le traitement des leucémies à tricholeucocytes (Huynh *et al.*, 2009) (pour revue sur les ANs : Jordheim *et al.*, 2013).



2.2 Mécanismes d'action

Les ANs pénètrent dans la cellule via les transporteurs de nucléosides (*cf. section 1.3*) (① de la figure 26). A l'intérieur de la cellule, les ANs sont phosphorylés par une série de kinases qui conduisent à l'accumulation d'ANs mono-, di- ou tri-phosphorylés (② de la figure 26) qui représentent les formes actives de ces drogues. Il est important de noter que la dCK permet de phosphoryler la majorité des analogues de cytidine utilisés en clinique (Hapke *et al.*, 1996). Ainsi, les

transporteurs de nucléosides et la dCK constituent deux éléments clés dans l'activité des ANs. Les ANs peuvent ensuite agir sur le métabolisme cellulaire selon deux voies :

① Les ANs sont capables d'inhiber certaines enzymes du métabolisme des nucléotides (③ de la figure 26). Par exemple, la RNR est inhibée par les dérivés triphosphates de la cladribine et de la fludarabine mais également par le dérivé diphosphate de la gemcitabine. En outre, la CTP synthétase est quant à elle inhibée par la dFdCTP, dérivée de la gemcitabine, ce qui induit une diminution des pools de CTP et de dCTP (Jordheim *et al.*, 2005).

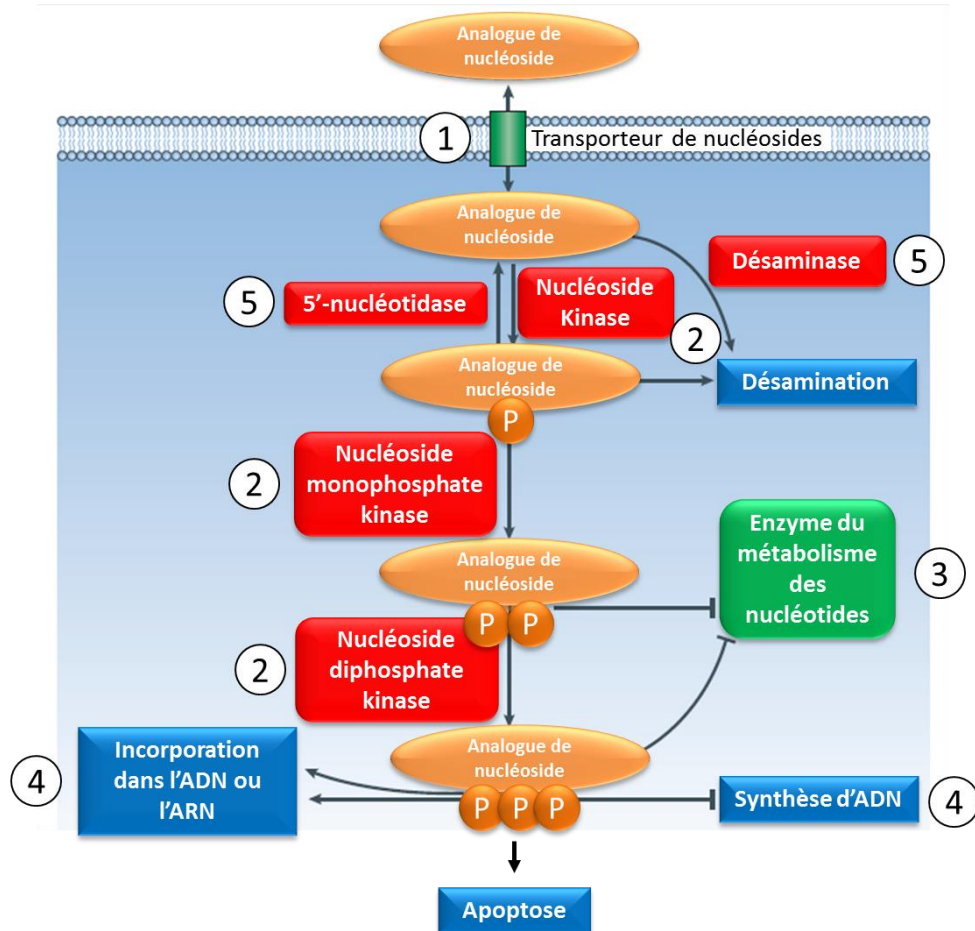


Figure 26 : Mécanismes d'action des analogues de nucléosides.

① Les ANs vont pénétrer dans la cellule via les transporteurs de nucléosides puis ② différentes kinases vont prendre en charge les ANs produisant des formes mono-, di- ou triphosphorylés. Ces formes actives vont pouvoir ③ inhiber certaines enzymes du métabolisme des nucléotides ou ④ être incorporées dans l'ADN ou l'ARN ce qui induit l'arrêt de la synthèse d'ADN. Enfin, ⑤ des enzymes telles que des 5'-nucléotidases ou des désaminases peuvent contrebalancer l'effet des ANs en les métabolisant, les rendant ainsi inactifs (adapté de Jordheim *et al.*, 2013).

② Les ANs vont également être utilisés en tant que substrats par les polymérases conduisant à leur incorporation dans l'ADN ou l'ARN (④ de la figure 26). Cela peut conduire à la terminaison de l'élongation, à l'accumulation de mutations ou à l'activation de l'apoptose. Par exemple, en réponse à la gemcitabine, p53 est phosphorylée sur la sérine 15 par la DNA-PK ce qui induit l'apoptose (Achanta *et al.*, 2001). De façon intéressante, le statut p53 pourrait influencer la réponse aux ANs (Galmarini *et al.*, 2003), même si la corrélation n'est pas toujours observée (Rieger *et al.*, 1999). De plus, p53 pourrait également participer à des phénomènes de résistance aux ANs. En effet, elle possède une activité 3'-5'-exonucléasique et pourrait agir dans l'excision des ANs incorporés dans l'ADN. Néanmoins, cette activité a principalement été décrite par des études *in vitro*, et semble très faible *in vivo* (Feng *et al.*, 2000).

Enfin, il est important de prendre en compte le fait que certaines enzymes du catabolisme des nucléosides telles que des désaminases ou des 5'-nucléotidases, peuvent entraver l'activité de ces analogues en les métabolisant (⑤ de la figure 26). Par exemple, la CDA est capable de métaboliser l'AraC et la gemcitabine entraînant ainsi leur inactivation.

2.3 Résistance à ces analogues

Des résistances aux traitements basés sur des ANs ont été observées et soulignent le fait que l'activité de ces molécules peut être restreinte par différents mécanismes. Deux principaux modes de résistances à ces drogues sont décrits : ① le premier implique les transporteurs de nucléosides présents à la surface des cellules, ② alors que le second implique certaines enzymes cellulaires.

① Comme abordé précédemment, il existe des récepteurs membranaires capables de faciliter l'entrée des nucléosides dans la cellule (*cf. section 1.3*). Du fait de leur forte ressemblance avec les nucléosides, les ANs vont également pénétrer dans la cellule *via* certains de ces transporteurs (Tableau 5). La capacité de ces derniers à permettre l'entrée dans la cellule des ANs va donc être déterminante pour la biodisponibilité et l'activité de ces derniers (pour revue : Pastor-Anglada et Pérez-Torras, 2015). Il faut néanmoins noter que les modifications chimiques effectuées sur les ANs peuvent également perturber leur interaction avec les transporteurs de nucléosides classiques tout en favorisant leur interaction avec d'autres types de transporteurs. Par exemple la famille SLC22 qui code pour des transporteurs de cations ou d'anions organiques a également été décrite comme participant à l'entrée de certains ANs dans la cellule (Minuesa *et al.*, 2011).

L'activité des transporteurs de nucléosides est influencée par de multiples facteurs et semble très variable en fonction des individus (Nies *et al.*, 2009 ; Sakamoto *et al.*, 2013 ; Prasad et Unadkat,

2014). Ainsi, l'hétérogénéité inter-individus observée en réponse à des traitements à base d'ANs pourrait être associée aux différences d'activités des transporteurs existantes entre les patients. La réponse des patients à une thérapie basée sur les ANs est ainsi souvent corrélée à l'expression de ces transporteurs. Par exemple, l'expression de ENT1 a été corrélée à l'activité de l'AraC ou de la fludarabine chez des patients atteints de leucémies (Galmarini *et al.*, 2002a ; Galmarini *et al.*, 2002b). Une diminution de ENT1 a également été associée à une résistance à la gemcitabine chez des patients atteint d'un cancer du pancréas (Spratlin *et al.*, 2004). Enfin, des résultats similaires ont été obtenus avec ENT2 dont l'expression est associée à une sensibilité à la fludarabine *in vitro* (Molina-Arcas *et al.*, 2005). Comme attendu, les ANs perméables tels que l'elacytarabine ne sont pas affectés par l'expression des transporteurs de nucléosides (Rizzieri *et al.*, 2014). Le développement des « transportomes » constitue donc une approche prometteuse afin d'adapter les traitements à base d'ANs à chaque patient (Pastor-Anglada et Pérez-Torras, 2015).

Nom de la drogue	Usage thérapeutique	Analogue à	Approuvée par la FDA	Transporteurs associés	Références
Mercaptopurine	Pathologie lymphoproliférative	Purine	1953	CNT3, ENT1, ENT2	Fotoohi et al., 2006; Yao et al., 2011
Cytarabine	Pathologie lymphoproliférative	Pyrimidine	1969	CNT1, ENT1, ENT2	Smith et al., 2004; Clarke et al., 2006
Fludarabine	Pathologie lymphoproliférative	Purine	1991	CNT2, CNT3, ENT1, ENT2	King et al., 2006
Pentostatine	Pathologie lymphoproliférative	Purine	1991	ENT1, ENT2	Wiley et al., 1991
Cladribine	Pathologie lymphoproliférative	Purine	1993	CNT2, CNT3, ENT1, ENT2	King et al., 2006
Azacytidine	Pathologie lymphoproliférative	Pyrimidine	2004	CNT1, CNT2, CNT3, ENT1, ENT2, ENT3, ENT4	Rius et al., 2009; Damaraju et al., 2012
Clofarabine	Pathologie lymphoproliférative	Purine	2004	CNT2, CNT3, ENT1, ENT2	King et al., 2006
Nelarabine (AraG)	Pathologie lymphoproliférative	Purine	2005		
Décitabine	Pathologie lymphoproliférative	Pyrimidine	2006	ENT1, ENT2	Damaraju et al., 2012
Floxuridine	Tumeurs solides	Pyrimidine	1970	CNT1, CNT2, CNT3	Lang et al., 2001; Smith et al., 2004; Hu et al., 2006
Gemcitabine	Tumeurs solides	Pyrimidine	1996	CNT1, CNT3, ENT1, ENT2, ENT3	Mackey et al., 1999; Hu et al., 2006; Govindarajan et al., 2009
Capecitabine (5-DFUR)	Tumeurs solides	Pyrimidine	1998		
5-Fluorouracile	Tumeurs solides	Pyrimidine	1998	ENT1, ENT2, OAT2	Kobayashi et al., 2005; Yao et al., 2011

Tableau 5 : Analogues de nucléosides utilisés dans le traitement de cancers (d'après Pastor-Anglada et Pérez-Torras, 2015).

➊ Plusieurs enzymes peuvent être à l'origine d'une inactivation des ANs. Les 5'-nucléotidases catalysent la déphosphorylation des nucléosides monophosphorylés. En outre, les désaminases telles que la CDA, l'ADA et la dCMP désaminase transforment les dérivés d'adénosine en inosine et les dérivés de cytidine en dérivés d'uridine (Figure 26). L'activité de la CDA est ainsi corrélée à la réponse

à des traitements à base de dérivés de cytidines (pour revue : Serdjebi *et al.*, 2015). Les enzymes de réparation de l'ADN sont également potentiellement impliquées dans la résistance aux ANs incorporés bien que le mécanisme de réparation concerné ne soit pas connu. Un rôle de l'endonucléase APE1 dans l'excision de bases des ANs incorporés est fortement probable (Demple et Sung, 2005). Cette hypothèse est soutenue par le fait qu'une exonucléase de 30 kDa capable d'exciser l'AraCMP de l'extrémité 3' de l'ADN a par ailleurs été identifiée (Perrino *et al.*, 1999).

Etant donné que les ANs doivent subir différentes modifications (notamment des phosphorylations) pour devenir actifs, les enzymes responsables de ces réactions sont donc primordiales pour l'activité des ANs, leur absence conduisant à une diminution de leur efficacité. Par exemple, la dCK catalyse la phosphorylation de la majorité des dérivés de cytidine, elle constitue donc une enzyme clé dans la résistance des cellules aux ANs. En effet, des études menées sur des modèles cellulaires variés et devenus résistants par expositions prolongées à différents ANs, ont identifié que dans la majorité des cas la résistance est dépendante d'un déficit acquis en dCK. Ce phénomène a été observé dans des lignées humaines et murines traitées à l'AraC, la gemcitabine, la fludarabine et la cladribine (Månsson *et al.*, 1999 ; Gourdeau *et al.*, 2001 ; Chandra *et al.*, 2002 ; Galmarrini *et al.*, 2004 ; Jordheim *et al.*, 2004). Enfin, des patients souffrant d'AML et présentant un faible taux de dCK lors du diagnostic répondent moins bien et montrent une survie plus brève que des patients présentant un taux plus élevé de dCK (Galmarini *et al.*, 2003).

Ces exemples de résistances à des ANs mettent en avant la complexité du métabolisme des nucléotides. De plus, l'utilisation d'ANs pour induire la mort cellulaire met en lumière l'importance de la régulation du métabolisme des nucléotides dans le maintien de l'homéostasie cellulaire.

3. Déséquilibre du pool de nucléotides

Du fait de l'importance de la disponibilité et du maintien de la concentration relative de chaque nucléotide, un déséquilibre du pool de nucléotides a des conséquences génétiques importantes. On parle de déséquilibre relatif lorsqu'un dNTP est sur- ou sous-représenté par rapport aux autres, et de déséquilibre absolu lorsque le pool est affecté de manière globale et que les proportions entre les dNTPs ne sont pas modifiées (pour revue : Kunz *et al.*, 1994).

3.1 Les sources d'un déséquilibre

L'altération des niveaux de dNTPs peut être provoquée dans des cellules en culture par différentes voies : via ❶ l'inactivation de gènes contrôlant les étapes de biosynthèse, ou de

catabolisme des dNTPs ou le traitement avec des drogues qui inhibent des enzymes nécessaires soit à la synthèse des dNTPs soit à la synthèse de folates réduits (qui sont des cofacteurs essentiels à l'activité de la TMP synthétase), ou via ❷ l'ajout au milieu de culture de bases ou de nucléosides. Le déséquilibre du pool de dNTPs est à l'origine de mutations, d'événements de recombinaison, de réarrangements et de cassures chromosomiques, ce qui entraîne de l'instabilité génétique pouvant favoriser la transformation oncogénique des cellules (pour revue : Kunz *et al.*, 1994).

❶ La dérégulation des enzymes impliquées dans le métabolisme des nucléotides constitue la principale source de déséquilibre du pool de nucléotides. Des études menées chez *E. Coli*, certaines ayant été confirmées chez les eucaryotes, ont ainsi montré que la mutation de différentes enzymes du métabolisme des nucléotides conduit à un déséquilibre du pool de nucléotides associé à de la mutagénèse (Mathews, 2014).

Etant donné le rôle central de la RNR dans la synthèse de dNTPs (*cf. section 1.2*), il n'est pas surprenant de la retrouver impliquée dans des déséquilibres du pool de nucléotides. Ainsi des mutations localisées dans la région nécessaire à sa dimérisation, et donc à son activité, induisent un phénotype mutateur chez la levure (Kumar *et al.*, 2010). Les mêmes observations ont été faites chez la bactérie *E. Coli*, la mutation des sites de régulation allostérique de la RNR conduisant à un phénotype mutateur (Ahluwalia *et al.*, 2012). Toujours chez *E. Coli*, la surexpression d'une RNR recombinante entraîne un accroissement global du pool de dNTPs d'un facteur 3 à 5, ce qui induit une augmentation jusqu'à 40 fois de la fréquence de mutations spontanées (Wheeler *et al.*, 2005).

Des mutations affectant d'autres enzymes du métabolisme des nucléotides ont également été associées à un phénotype mutateur. La nucléoside diphosphate (NDP) kinase convertit les dNDPs et les rNDPs en leurs formes triphosphatées correspondantes, elle est donc impliquée dans la synthèse d'ADN et d'ARN. Chez *E. Coli*, les mutations de la NDP kinase affectent à la fois l'équilibre du pool de nucléotides et le taux de mutation (Lu *et al.*, 1995). La concentration de dCTP augmente alors que celle de dATP chute, selon un mécanisme inconnu. Les mutations observées sont des transversions (remplacement d'une purine par une pyrimidine, ou inversement) A.T → T.A suivi d'un dCTP (Schaaper et Mathews, 2013 ; Cupples et Miller, 1989). Les mutations observées sont donc sans doute provoquées par un « effet du nucléotide suivant » (*cf. section suivante*) lié à l'excès de dCTP. Certaines données suggèrent également une accumulation de dUTP qui pourrait expliquer le phénotype mutateur selon un mécanisme impliquant la saturation de la voie de réparation du BER (Nordman et Wright, 2008).

La dCTP désaminase catalyse la désamination de la dCTP en dUTP. La mutation de cette enzyme chez *E. Coli* conduit à l'accumulation de dCTP associée à des mutations de transversion G.C → T.A et A.T → T.A. De manière similaire à la mutation de la NDP kinase, le nucléotide présent juste après ces mutations est une dCTP, suggérant encore une fois un « effet du nucléotide suivant » (Cupples et Miller, 1989).

La dCMP désaminase catalyse la désamination de la dCMP en dUMP et possède également un rôle central dans le contrôle de la taille du pool de dNTP. A travers son activation allostérique par la dTTP et son inhibition par la dCTP, cette enzyme maintient la balance au sein du pool de pyrimidine. Des études dans des cellules de mammifères indiquent que la déficience en dCMP désaminase induit une accumulation en dCTP associée à une déplétion en dTTP ce qui conduirait à un phénotype mutateur (Weinberg *et al.*, 1981). Des résultats similaires ont ensuite été décrits chez *S. cerevisiae*, où la mutation du gène codant pour la dCMP désaminase provoque un phénotype mutateur similaire (Kohalmi *et al.*, 1991). De façon intéressante, chez *S. pombe*, l'effet de la déplétion de la dCMP désaminase est encore plus délétère. On y retrouve en effet un phénotype mutateur mais également des conséquences plus graves sur la stabilité génétique telles que des effondrements de fourches de réplication et l'activation de multiples points de contrôle en réponse à des dommages de l'ADN (Sánchez *et al.*, 2012). Enfin, dans les cellules de mammifères, l'effet mutateur de l'élévation du niveau de dCTP associée à un défaut de dCMP désaminase (ou de CTP synthétase) est atténué par l'ajout de thymidine, ce qui permet de restaurer l'équilibre du ratio dCTP/dTTP (Meuth, 1981 ; Weinberg *et al.*, 1985 ; Mun et Mathews, 1991).

La dGTP triphosphohydrolase catalyse le clivage de dGTP en désoxyguanosine et en triphosphate. Chez *E. Coli*, la mutation de ce gène conduit à un phénotype mutateur associé à des transversions G.C → C.G et à des transitions (remplacement d'une purine par une purine ou d'une pyrimidine par une pyrimidine) A.T → G.C (Gawel *et al.*, 2008). Le pool de nucléotides n'a pas été mesuré dans cette étude mais le phénotype de la déficience en dGTP triphosphohydrolase est reproduit par un traitement induisant l'accumulation de dGTP (Gawel *et al.*, 2008).

Enfin la polynucléotide phosphorylase (PNP) catalyse le retrait des phosphates de l'ARN ou des rDNPs qui sont les précurseurs directs des désoxyribonucléotides grâce à la RNR. Chez *E. Coli*, la mutation de ce gène confère un effet anti-mutateur corrélé à une diminution du taux de mutations (substitutions ou décalages du cadre de lecture) (Becket *et al.*, 2012). Cette étude soulève le rôle des ribonucléotides dans la fidélité de la réplication de l'ADN qui semble plus important que ce qui avait été initialement décrit (pour revue : Mathews, 2014). Des études ont ainsi montré que l'activité de la RNR pourrait être régulée par la concentration relative de chaque rDNPs *in vivo*. Ainsi, une déplétion

partielle du pool de rDNPs pourrait diminuer *in vivo* l'activité de la RNR avec pour conséquence une diminution de la concentration en dNTPs (Chimploy et Mathews, 2001).

② L'ajout de bases ou de nucléosides dans le milieu de culture constitue également une source de déséquilibre du pool de nucléotides. Par exemple, l'ajout au milieu de culture de nucléosides ou de NMP (pour des cellules perméabilisées) induit une mutagénèse et ce de la bactérie au mammifères (Parkash, 1967 ; Rossman et Stone-Wolff, 1982 ; Brendel, 1985 ; Arecco *et al.*, 1988 ; Wilinon et McKenna, 1989 ; Mattano *et al.*, 1990 ; Kohalmi *et al.*, 1991). En outre, l'ampleur de la mutagénèse provoquée par ajout de thymidine est corrélée au degré d'accroissement du pool de dTTP. Dans des cellules CHO (« *Chinese Hamster Ovary* »), cet effet mutagène est considérablement réduit par l'ajout en parallèle de désoxycytidine, démontrant une fois encore l'importance de l'équilibre du ratio dCTP/dTTP (Meuth, 1981b ; Rossman et Stone-Wolff, 1982 ; Goncalves *et al.*, 1984 ; Weinberg *et al.*, 1985 ; Wilinon et McKenna, 1989 ; Kohalmi *et al.*, 1991 ; Mun et Mathews, 1991).

Ces différents exemples de déséquilibres du pool de nucléotides associés à des phénotypes mutateurs illustrent l'importance de la régulation fine du métabolisme des nucléotides pour la fidélité de la réplication et pour le maintien de la stabilité du génome (pour revues : Mathews, 2014).

3.2 Déséquilibre du pool de nucléotides et fidélité de la réplication

Les polymérases à ADN jouent un rôle primordial dans la réplication de l'ADN. En utilisant les dNTPs comme substrats, elles vont catalyser la synthèse d'un nouveau brin d'ADN à partir d'un brin d'ADN matrice. Affecter le pool de nucléotides va donc inévitablement affecter la réplication et en particulier la fidélité des polymérases.

Plusieurs études ont permis d'évaluer les effets d'un déséquilibre du pool de nucléotides sur la fidélité de la réplication. Des travaux réalisés *in vitro*, ont ainsi permis d'explorer les mécanismes biochimiques engendrant la génération des mutations évoquées dans la section précédente.

Au niveau de plusieurs étapes du cycle de polymérisation du brin d'ADN, effectué à partir d'un brin d'ADN matrice, les concentrations absolues et relatives de chaque nucléotide sont cruciales pour déterminer la fidélité de la réplication. Les étapes concernées sont ① l'étape de dissociation du dNTP du complexe polymérase-ADN_n, ② le changement de conformation nécessaire pour positionner le complexe tertiaire afin de former le pont chimique et enfin ③ la formation du pont chimique. Ces étapes sont principalement affectées par le fait que la probabilité pour qu'un

nucléotide complémentaire ou non complémentaire se lie à l'ADN est dépendante de la proportion des substrats en compétition. Ainsi, pour un événement d'incorporation donné, l'augmentation *in vitro* de la concentration du dNTP complémentaire au brin matrice augmente la fidélité de l'incorporation. A l'inverse, l'augmentation de la concentration d'un dNTP non complémentaire au brin matrice augmente le taux d'incorporation erronée (pour revue : Kunz *et al.*, 1994). De plus, la variation de la concentration absolue des dNTPs (déséquilibre absolu) peut également affecter la fidélité de l'incorporation. Ce type de déséquilibre peut altérer l'équilibre qui s'établit entre la poursuite du cycle par incorporation d'un nouveau dNTP et l'excision exonucléotidique du dNTP incorporé si celui-ci n'est pas complémentaire du brin matrice. En effet, si le nucléotide incorporé est le bon alors le cycle suivant d'incorporation est favorisé. En revanche, si le nucléotide n'est pas complémentaire, celui-ci est détecté par l'activité de relecture de la polymérase (« *proofreading* ») et son excision est induite. Néanmoins, si la concentration du nucléotide suivant à incorporer est augmentée alors son taux d'incorporation va être augmenté également conduisant ainsi à la stabilisation du mésappariement précédent, on parle alors « d'effet du nucléotide suivant ». Cet effet a été observé dans plusieurs études basées sur des polymérases purifiées et résulte probablement de l'inhibition, par la quantité de nucléotides disponibles, de l'activité de « relecture » de la polymérase, détériorant ainsi sa fidélité (pour revues : Kunkel, 1988 ; Kunz *et al.*, 1994).

En plus des substitutions de bases qui sont la conséquence directe de la mauvaise incorporation d'un nucléotide non complémentaire, le déséquilibre du pool de nucléotides peut également générer des mutations selon trois mécanismes différents : par glissement, par mésappariement/réalignement et par dislocation (pour revue : Kunkel, 1992). Les mutations résultant d'un glissement peuvent notamment être produites au niveau de séquences répétées. La poursuite de la polymérisation sur ce type de séquences peut mener à la délétion d'une base si le nucléotide mésapparié est dans le brin matrice ou à une addition si le nucléotide mésapparié est dans le brin synthétisé. De façon alternative, le mécanisme de mésappariement/réalignement résulte d'un réarrangement dans le brin d'ADN matrice à la suite d'une mauvaise incorporation, et peut produire un substrat avec une paire de bases correcte à l'extrémité 3', ce qui favorise la poursuite de la polymérisation. Par ces deux mécanismes, une mutation de type « décalage de cadre de lecture » est générée. Enfin, le mécanisme de dislocation consiste en un glissement du brin d'ADN, suivi d'une incorporation de nucléotide correcte puis d'un réalignement menant à la formation d'une substitution de base (pour revue : Kunkel, 1990).

3.3 Déséquilibre du pool de nucléotides et vitesse de réplication

Comme évoqué précédemment, la concentration intracellulaire moyenne des dNTPs est estimée à 5-35 μM environ (pour revue : Dresler *et al.*, 1988) et des études avec des cellules synchronisées montrent que le pool de dNTPs fluctue dramatiquement durant le cycle cellulaire avec une valeur maximale en phase S. Or, les valeurs de K_m des polymérases eucaryotiques sont de l'ordre de 1 à 3 μM (Dresler *et al.*, 1988). Cette donnée suggère que la concentration en dNTP dans les cellules eucaryotes est bien supérieure au K_m des polymérases, et donc que les réplisomes opèrent vraisemblablement avec une concentration saturante ou proche de la saturation en substrats. Cependant, des données contradictoires remettent en question cette observation. Chez la levure, la surexpression de la sous-unité R1 de la RNR ou l'inhibition de la protéine inhibitrice de la RNR, Sml1, conduit à une accumulation en dNTPs. Celle-ci entraîne une augmentation de la vitesse d'élongation de l'ADN (Poli *et al.*, 2012) suggérant ainsi, qu'au moins chez la levure, le pool de dNTPs est limitant pour la réplication de l'ADN. Des résultats similaires ont été observés chez la bactérie *E. coli*, dans laquelle l'augmentation en dNTPs stimule la vitesse de progression des fourches de réplication (Yao *et al.*, 2013). À l'inverse, dans les cellules humaines, nous avons montré au laboratoire que la déplétion en CDA entraîne une accumulation en dCTP associée à un ralentissement de la vitesse des fourches de réplication de l'ordre de 20% (Chabosseau *et al.*, 2011).

Les effets d'un déséquilibre du pool de nucléotides sur la vitesse de progression des fourches de réplication semblent donc complexes et dépendent probablement de l'organisme et du type de déséquilibre.

3.4 Déséquilibre du pool de nucléotides et cassures chromosomiques

Des cassures chromosomiques sont induites par des mutations génétiques ou des drogues inhibant la biosynthèse de dTMP et conduisant donc à la déplétion en dTTP, et ceci dans de nombreux organismes dont les plantes, la souris, et l'humain. De telles cassures surviennent également dans des cellules traitées avec diverses bases et nucléosides : la désoxyadénosine et la thymidine par exemple. Des temps de traitements prolongés provoquent des fragmentations chromosomiques, et expliquent la formation de micronoyaux observée dans ces conditions (pour revue : Kunz *et al.*, 1994).

En outre, des données soulignent l'implication d'un déséquilibre du pool de dNTPs dans l'augmentation du nombre de cassures chromosomiques se produisant au niveau de certains sites fragiles. En effet, plusieurs sites fragiles sont sensibles à la quantité de folate (nécessaire à la

synthèse de dTMP) du milieu de culture cellulaire, dont le site fragile FRAXA (site fragile du chromosome X associé au syndrome du X fragile). Les cassures de l'ADN au niveau de ces sites sont plus fréquentes lors d'une déplétion en folate, alors que la complémentation en folate diminue largement leur fréquence (Sutherland *et al.*, 1983 ; Green *et al.*, 1988 ; Reidy, 1988 ; Sutherland, 1988 ; Kunz *et al.*, 1994). La cause de l'« expression » des sites fragiles sensibles au folate est la déplétion en dTMP. En effet, l'addition de thymidine au milieu permet d'inhiber la formation de cassures. En outre, l'augmentation du nombre de cassures au niveau de différents sites fragiles a été reproduite avec des inhibiteurs de la synthèse de dTMP (Glover, 1981 ; Tommerup *et al.*, 1981 ; Brookwell *et al.*, 1982 ; Jacobs *et al.*, 1982 ; Jacky et Sutherland, 1983 ; Hori *et al.*, 1985). Par ailleurs, l'ajout en excès de thymidine au milieu de culture induit également une « expression » des sites fragiles sensibles au folate mais cet effet peut être contrebalancé par l'ajout simultané de désoxycytidine, laissant envisager que l'altération du ratio dCTP/dTTP est reliée à la formation des cassures sur ces sites fragiles (Sutherland *et al.*, 1985 ; Sutherland et Baker, 1986, Sutherland, 1988).

En accord avec le fait qu'un nombre augmenté de cassures de l'ADN conduit à une augmentation du nombre d'événements de recombinaison, l'effet clastogène du déséquilibre de pool de dTTP est associé à une induction des échanges entre chromatides sœurs et entre chromosomes. En effet, l'inhibition de la dTMP synthétase, le traitement au méthotrexate, ou un fort excès de thymidine dans le milieu cellulaire provoquent une augmentation du taux de SCE (Banerjee et Benedict, 1979 ; Perry, 1983 ; Hori *et al.*, 1984).

3.5 Déséquilibre du pool de nucléotides et cycle cellulaire

La levure *S. cerevisiae* possède un point de contrôle de l'intégrité du génome élaboré agissant comme senseur de stress de réplication. Une partie de ce point de contrôle agit via la voie Mec1-Rad53-Dun1 agissant sur la RNR pour s'assurer que le pool de dNTPs est en quantité adéquate et équilibrée (Zhao *et al.*, 2001). Les homologues humains (ATM et Chk2) de Mec1 et Rad53 régulent en amont p53, elle-même responsable de la régulation de la sous-unité p53R2 de la RNR. Dun1 est une protéine kinase qui agit, en phase S ou lors de dommages de l'ADN, en phosphorylant Sml1, une protéine inhibitrice de la RNR. La phosphorylation de Sml1 conduit à sa dégradation par le protéasome. Chez l'humain, la voie ATM-Chk2 (Mec1-Rad53-Dun1) est activée dans des cellules pré-tumorales de différents tissus et en réponse à un stress de réplication (Bartkova *et al.*, 2005 ; Gorgoulis *et al.*, 2005). Son activation est également associée à la stimulation de l'activité de la RNR entraînant une accumulation en dNTPs, dont la concentration se retrouve augmentée de manière équilibrée d'un facteur 6 à 8 (Zhao et Rothstein, 2002).

Comme cité précédemment, des ratios anormaux entre les dNTPs sont hautement mutagènes. Ainsi, la génération de différents mutants de la RNR au niveau de sites impliqués dans sa spécificité conduit à un potentiel mutagène élevé (Kumar *et al.*, 2010). Dans ce cas, le point de contrôle est activé lorsque un ou plusieurs dNTPs sont déplétés, mais pas lorsque les quatre pools sont présents en nombre suffisant même lors d'un déséquilibre. Il est donc intéressant de noter que les conséquences d'un pool quantitativement élevé mais hautement dérégulé ne semblent pas être suffisamment délétères pour l'ADN pour activer le point de contrôle de phase S (Kumar *et al.*, 2010).

3.6 Déséquilibre du pool de nucléotides et oncogènes

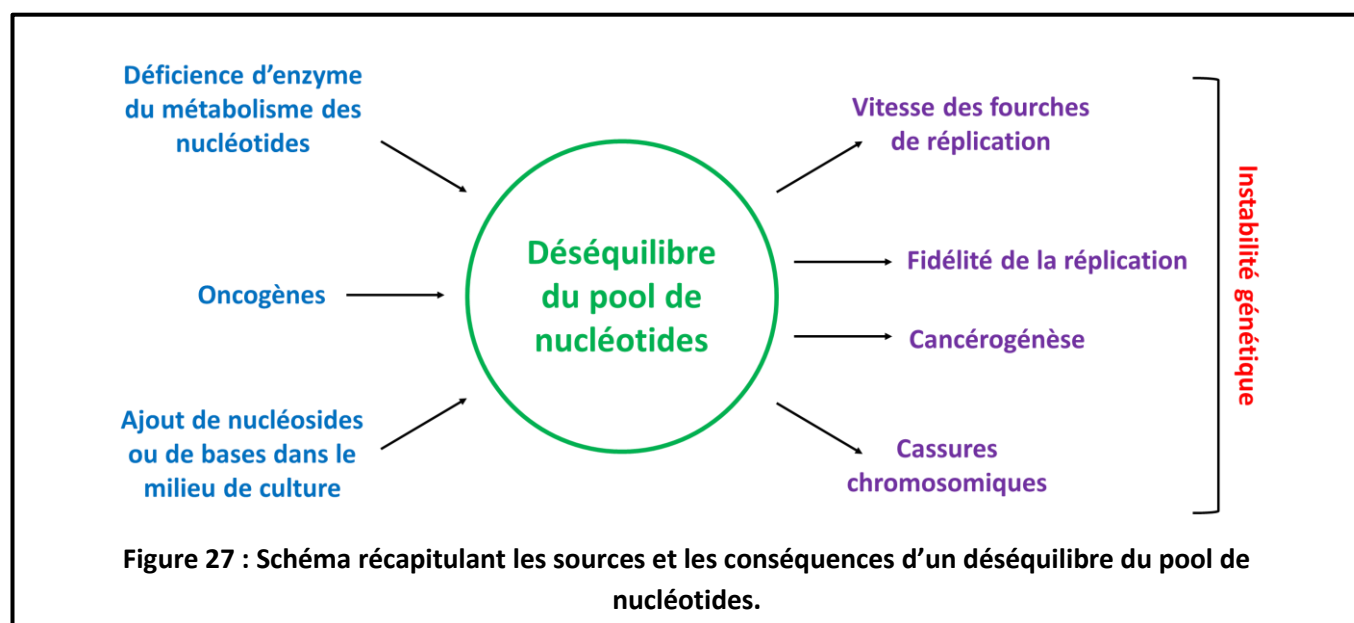
Il existe de plus en plus de données évoquant une connexion entre le métabolisme des nucléotides et l'expression d'oncogènes. Par exemple, la synthèse des dNTPs est contrôlée par l'oncogène C-MYC. En effet, la déplétion de ce dernier conduit à la répression de plusieurs gènes impliqués dans la synthèse des nucléotides tels que ceux codant pour la thymidilate synthétase, l'inosinate déshydrogénase 2 et de la PRPP synthétase 2. Ceci a pour conséquence une déplétion subséquente du pool de dNTPs et un ralentissement du cycle cellulaire. A l'inverse, la surexpression de C-MYC stimule l'expression de ces trois gènes conduisant à l'accumulation des dNTPs (Mannava *et al.*, 2008). On peut alors supposer que lors de la transformation tumorale, la surexpression de C-MYC et l'augmentation du pool de dNTPs qui en découle pourraient permettre de fournir une quantité suffisante de nucléotides aux cellules tumorales qui présentent une prolifération très rapide.

Il existe également un lien entre le métabolisme de la thymidine et l'expression de l'oncogène FHIT. Une des altérations génétiques précoces des pré-néoplasies est l'altération des sites fragiles conduisant à la perte d'expression de la protéine FHIT. Dans différentes lignées cellulaires, la perte de FHIT est liée à une diminution de l'expression de la thymidine kinase 1 associée à la chute subséquente du pool de dTTPs ; cet effet pouvant être prévenu par l'ajout exogène de thymidine (Saldivar *et al.*, 2012).

Une relation entre le niveau de RNR et l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl2 a récemment été identifiée dans la régulation négative de la transition G1-S (Xie *et al.*, 2014). La surexpression de Bcl2 dans un modèle murin promeut le développement de lymphomes notamment en diminuant l'activité de la RNR ce qui induit la déplétion en dNTPs. Au moins une partie du mécanisme est médiée par la perturbation de l'interaction entre les sous-unités R1 et R2 nécessaire au fonctionnement de la RNR (Xie *et al.*, 2014).

Enfin, des données intéressantes suggèrent que le pool de nucléotides pourrait être impliqué dans les étapes précoces de la cancérogénèse. En effet, la dérégulation du cycle cellulaire par l'activation aberrante des oncogènes E6/E7 du virus HPV ou de la cycline E conduit à un appauvrissement significatif en nucléotides dans les cellules néo-transformées associé à un stress de réplication et à de l'instabilité génétique (Bester *et al.*, 2011). La supplémentation par apport exogène de nucléosides permet de prévenir le stress de réplication et diminue la transformation des cellules après expression des oncogènes. De la même manière, la surexpression de C-MYC stimule la synthèse de nucléotides et prévient le stress de réplication (Bester *et al.*, 2011). Ces résultats suggèrent que lors des étapes précoces de la cancérogénèse, lorsque les cellules acquièrent un taux de prolifération très élevée, la quantité de nucléotides n'est alors plus suffisante pour supporter une réplication correcte. Les cellules vont donc se diviser avec trop peu de nucléotides, ce qui engendre un stress de réplication et de l'instabilité génétique, favorisant ainsi la cancérogénèse.

Les sources et conséquences d'un déséquilibre du pool de nucléotides sont illustrées figure 27.



3.7 Nucléotides et pathologies humaines

Différentes pathologies humaines ont été associées à des désordres innés du pool des purines et des pyrimidines (P&P). Elles se caractérisent par une concentration anormale de purines ou de pyrimidines dans les fluides biologiques ou dans les cellules, résultant d'une activité altérée de certaines enzymes du métabolisme des nucléotides (Van Gennip, 1999). Au total, 30 déficiences en ces enzymes, dont 17 significatives d'un point de vue clinique, sont associées à des pathologies humaines (Van Gennip *et al.*, 2006 ; Jurecka, 2009) (*cf. annexes, section « Pathologies associées à des*

désordres métaboliques des purines ou pyrimidines », p.283). Celles-ci constituent un groupe hétérogène avec des symptômes cliniques changeants et un taux de prévalence faible. Ces maladies peuvent affecter tout l'organisme de manière variable ce qui induit une mortalité infantile et une morbidité élevée. Le diagnostic rapide de ces pathologies est donc primordial. Cependant, celles-ci ressemblent souvent à d'autres maladies du métabolisme plus classiques. En outre, l'absence de symptômes dans certains cas complique encore le diagnostic (Jurecka, 2009). Les symptômes associés à ces pathologies sont répertoriés dans le Tableau 6.

Medical specialty	Signs and symptoms
Gastroenterology	Emesis, diarrhoea, malabsorption, borborygmi, diverticulosis, pseudo-obstruction, hepatomegaly, progressive liver failure
Medical genetics	Dysmorphic features, microcephaly, congenital anomalies of urogenital and colorectal system ^a
Haematology	Anaemia (normocytic, megaloblastic, haemolytic, Diamond–Blackfan syndrome), splenomegaly
Immunology	Recurrent infections, immunodeficiency, lymphopenia (T/B cells)
Nephrology	Crystalluria, orange sediment in urine, haematuria, urinary tract infections, nephrolithiasis (uric acid, xanthine, 2,8-dihydroxyadenine), acute/chronic renal insufficiency
Neonatology	Congenital sensorineural deafness, congenital blindness, hypotonia, microsomia, crystals on the diaper or tip of penis, neonatal fitting, persistent neonatal hepatitis
Neurology	Hypo-/hypertonia, growth delay, motor/mental retardation, seizures, microcephaly, autistic features, stereotypies, dystonia, dysarthria, ataxia, choreoathetosis, self-mutilation, polyneuropathy, myopathy, exercise related muscle cramps, muscle weakness, myalgia
Ophthalmology	Congenital blindness, optic nerve atrophy, fundus hypopigmentation, retinitis pigmentosa, ocular lens dislocation, megalocornea, iris and choroidea colobomata, strabismus, ophthalmoplegia, ptosis
Oncology	Neoplasms, pharmacogenetic syndrome
Orthopaedics	Scoliosis
Paediatrics	Any of the above and below, height and weight deficiency, cachexia
Radiology	Increased echogenicity of kidneys, chondro-osseous dysplasia MRI: delayed myelinization, hypomyelination, atrophy of cerebrum, atrophy of cerebellum
Rheumatology	Arthritis, arthralgia, gout
Biochemistry	Anaemia (normocytic, megaloblastic, haemolytic, aplastic), lymphopenia (T and B cells/T cells), thrombocytopenia, hypo-/hyperuricaemia, hypo-/hyperuricosuria, orotic aciduria, sulfaturia, lactic acidosis, hypoglycaemia, transaminasaemia
Other	Alopecia, acute life-threatening events (ALTE), mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy syndrome

Tableau 6 : Liste des symptômes associés aux désordres innés des P&P (d'après Jurecka, 2009).

En 1999, 835 patients ont été diagnostiqués pour un désordre inné des P&P dans dix-huit pays européens (Van Gennip, 1999). Plus récemment, le développement de l'HPLC couplée à de la spectrométrie de masse (MS) a permis d'améliorer le diagnostic des patients et leur prise en charge. Ainsi, une étude réalisée à l'aide de cette technique pendant treize ans a permis d'identifier 35 patients présentant six anomalies différentes provoquées par la déficience de certaines enzymes du pool de nucléotides, dont l'adénylosuccinate lyase, l'hypoxanthine guanine phosphoribosyltransférase (HPRT), la purine nucléoside phosphorylase, la xanthine déshydrogénase, le cofacteur molybdenum et la dihydropyrimidine déshydrogénase (Castro *et al.*, 2014).

L'approche thérapeutique pour traiter ces maladies consiste à déterminer les anomalies métaboliques spécifiques au patient, puis de les neutraliser par le contrôle de l'accumulation du substrat, par l'ajout exogène du produit du gène impliqué et/ou par thérapie de transfert de gène (Clarke, 2006). L'approche la plus utilisée actuellement étant l'absorption de molécules permettant de rétablir le pool de nucléotides (produit du gène dérégulé ou métabolite impliqué dans la voie de synthèse dérégulé) (Jurecka, 2009).

Il est intéressant de noter que l'AID (« *activation-induced cytidine deaminase* »), une protéine de la famille des cytidines désaminases, responsable de la désamination de la cytosine incorporé dans l'ADN en uracile (« *DNA editing enzyme* »), est associée à une pathologie humaine : le syndrome d'hyper IgM de type II (*cf. Annexe p.283*). En revanche la CDA n'a pas été décrite comme une cause de pathologie humaine à ce jour (Jurecka, 2009).

4. Cytidine désaminase (CDA) et instabilité génétique

Le gène *CDA* (1p36.2-p35) code pour la cytidine désaminase ou CDA, une enzyme de la voie de « sauvetage » des pyrimidines largement distribuée des procaryotes aux eucaryotes. Chez la bactérie, elle est nécessaire pour le recyclage de la cytidine et de la désoxycytidine, pour la synthèse de nucléotides ainsi que pour l'utilisation de la cytidine et de la désoxycytidine comme unique source de carbone et d'azote (Josephsen *et al.*, 1983). Chez l'homme, la CDA participe à la voie de « sauvetage » des pyrimidines et contribue à la désamination de certains analogues de nucléosides conduisant ainsi à leur inactivation (Serdjebi *et al.*, 2015).

La CDA est principalement exprimée selon trois variants CDA1, CDA2 et CDA3. Les deux premiers diffèrent au niveau du codon 27 qui présente respectivement soit une Glutamine soit une Lysine (Kühn *et al.*, 1993 ; Laliberté et Monparler, 1994 ; Micozzi *et al.*, 2014). Le variant CDA3 présente quant à lui une Thréonine au lieu d'une Alanine au codon 70 (Yue *et al.*, 2003 ; Fukunaga *et al.*, 2004). Le variant 2 représente la forme de la CDA la plus courante dans la population générale (environ 70% des allèles) alors que le variant 3 est peu fréquent et retrouvé principalement dans la population japonaise (Yue *et al.*, 2003).

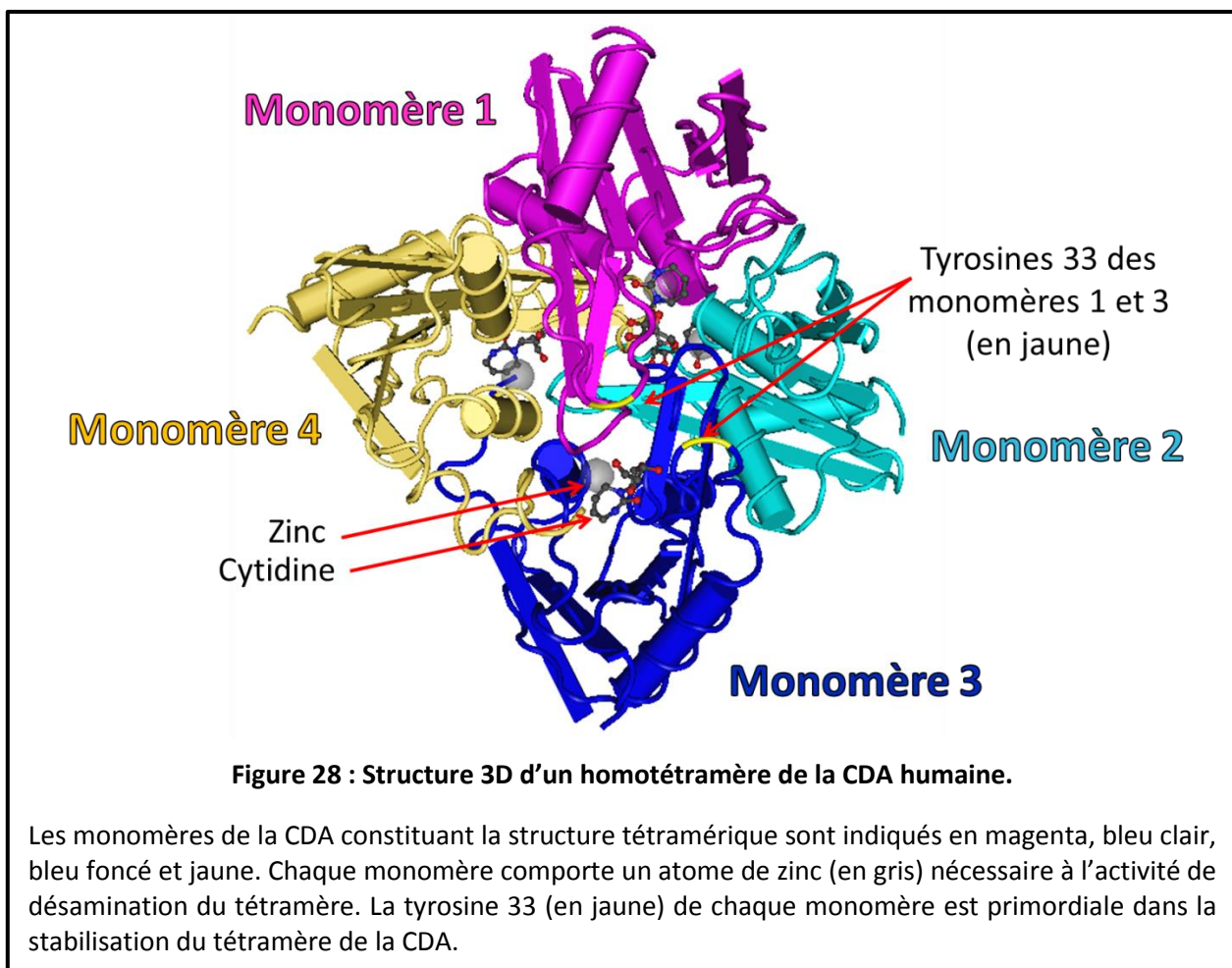
4.1 Activité enzymatique de la CDA

La CDA catalyse la désamination hydrolytique de la cytidine ou de la désoxycytidine en uridine ou désoxyuridine selon les réactions suivantes :

- ① $\text{Cytidine} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{uridine} + \text{NH}_3$
- ② $2'\text{-désoxycytidine} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2'\text{-désoxyuridine} + \text{NH}_3$

Comme énoncé auparavant, elle catalyse également la désamination de certains analogues de la cytidine comme l'AraC, l'aza-désoxy-cytidine (Aza-dC) et la gemcitabine ce qui induit leur inactivation pharmacologique (Camiener, 1967 ; Chabot *et al.*, 1983 ; Laliberté *et al.*, 1992 ; Vincenzetti *et al.*, 1996 ; Vincenzetti *et al.*, 2004 ; pour revue : Serdjebi *et al.*, 2015).

La CDA fonctionne sous forme homotétramérique et n'est fonctionnelle que sous cette forme, bien que chaque sous-unité lie une molécule de substrat indépendamment l'une de l'autre. Néanmoins, un monomère seul ne présente pas d'activité de désamination ce qui souligne l'importance de la forme tétramérique (Vincenzetti *et al.*, 1996 ; Vincenzetti *et al.*, 2000 ; Vincenzetti *et al.*, 2003). Celle-ci est stabilisée par la Tyrosine 33 de chaque monomère (Vincenzetti *et al.*, 2008, Micozzi *et al.*, 2010), et présente un atome de zinc par sous-unité (Vincenzetti *et al.*, 1996 ; Vincenzetti *et al.*, 1997 ; Micozzi *et al.*, 2014) (Figure 28).



Il existe différentes molécules capables d'inhiber l'activité enzymatique de la CDA parmi lesquelles on trouve la tétrahydrouridine (THU) ou la 5-fluorozebularine (FZEB) qui entravent son activité *in vitro* et *in vivo* (Camienner, 1967 ; Chabot *et al.*, 1983 ; Laliberté *et al.*, 1992 ; Vincenzetti *et al.*, 1996 ; Vincenzetti *et al.*, 2004 ; Ferraris *et al.*, 2014 ; Funamizu, 2012 ; Gemble *et al.*, 2015).

Concernant les caractéristiques physico-chimiques de la CDA, elles ont été déterminées à partir d'enzymes recombinantes exprimées chez *E. Coli*. Ainsi, pour les deux variants CDA1 et CDA2, les constantes de Michaelis (K_m) et les vitesses initiales maximales (V_{max}) ont été calculées pour différents substrats de l'enzyme. Le K_m correspond à la valeur de la concentration de substrat pour laquelle la vitesse de réaction enzymatique est égale à la moitié de la vitesse maximale, cette dernière correspondant à la vitesse de transformation d'un substrat par une enzyme en présence d'une concentration saturante de substrat. De plus, les constantes d'inhibitions (K_i), qui correspondent à la concentration en inhibiteur suffisante pour occuper la moitié des sites actifs de l'enzyme, ont été calculées pour différents inhibiteurs connus de la CDA (Tableau 7) (Vincenzetti *et al.*, 2004).

	K_m (10^{-5} M)		V_{max} (U/mg)		V_{max}/K_m			K_i (10^{-5} M)	
Substrats	CDA1	CDA2	CDA1	CDA2	CDA1	CDA2	Inhibiteurs	CDA1	CDA2
dC	4.2	4.0	50	45.5	11.9	11.4	FZEB	0.006	0.03
C	4.0	4.2	52	53	13	12.6	THU	0.7	0.7
5-I-dC	8.7	10.0	45	91	5.2	9.1	DHU	1.5	4.0
AraC	15.0	11.0	30	31	2	2.8	CV6	3.4	4.5
Aza-dC	31.0	28.0	32	38	1	1.3	U	31.0	31
							CMP	39.0	30

Tableau 7 : Paramètres cinétiques de substrats et inhibiteurs de la CDA.

dC : désoxycytidine ; C : Cytidine ; 5-I-dC : 5-iododésoxycytidine ; Ara-C : cytosine arabinoside ; Aza-dC, 5-azacytidine ; FZEB, 5-fluorozebularine ; THU : 3,4,5,6-tétrahydrouridine ; DHU : 5,6-dihydrouridine ; CV6 : acide (cytidyl)acryloylaminohéxanoïque ; U : uridine ; CMP : cytidine monophosphate (adapté de Vincenzetti *et al.*, 2004).

Le polymorphisme du codon 27 n'a que très peu de conséquences sur les constantes évoquées précédemment lorsqu'il s'agit des substrats classiques de la CDA. En revanche, les variants de la CDA

ne semblent pas métaboliser les analogues de nucléosides selon les mêmes constantes enzymatiques (Tableau 7) (Vincenzetti *et al.*, 2004).

4.2 Localisation et expression de la CDA

Il existe peu de données concernant la localisation subcellulaire de la CDA. Néanmoins, une étude a décrit la localisation de la protéine CDA endogène ou exogène dans quatre lignées cellulaires. Concernant la protéine endogène, les résultats sont similaires pour toutes les lignées cellulaires testées : la CDA localise dans le noyau sous forme de nombreux foyers et est observée dans le cytoplasme de manière plus diffuse. La surexpression dans ces mêmes lignées d'une protéine exogène couplée au tag « FLAG », montre que cette dernière localise majoritairement dans le noyau (Somasekaram *et al.*, 1999). Cette localisation nucléaire est rendue possible grâce à une séquence NLS (acides aminés 3 à 27), nécessaire et suffisante pour cibler la CDA au noyau. En outre, une interaction physique a été décrite entre la CDA et l'importine α , sous-unité du complexe formant le pore nucléaire. Ces résultats suggèrent qu'une partie de l'activité de la CDA pourrait avoir lieu dans le noyau (Somasekaram *et al.*, 1999). La localisation nucléaire de certaines enzymes de la voie de « sauvetage » renforce l'hypothèse d'une synthèse de nucléotides qui n'est pas exclusivement cytoplasmique. Enfin, la présence d'une activité de désamination dans le sérum (DeAngelis *et al.*, 1992 ; Sugiyama *et al.*, 2007 ; Ciccolini *et al.*, 2010) et de protéine CDA dans le milieu de culture de lignées cellulaires (Ge *et al.*, 2004), démontrent qu'il existe un export de cette dernière vers le milieu extracellulaire. Ce mécanisme d'export reste néanmoins inconnu à l'heure actuelle.

Concernant l'expression de la CDA, celle-ci varie en fonction des tissus et des cellules. Ainsi, le niveau de l'ARNm de la CDA est moyen à fort dans : les granulocytes, les leucocytes ainsi que dans les cellules placentaires, hépatiques, rénales, spléniques ou pulmonaires, dans le placenta, le foie, le rein, la rate et le poumon. A l'inverse, il n'y a pas ou peu d'expression de l'ARNm de la CDA dans le cerveau, les cellules encéphaliques, cardiaques et musculaires ainsi que dans les lymphoblastes B et T, les monocytes, le tissu cardiaque et le tissu musculaire (Kuhn *et al.*, 1993 ; Laliberté et Momparler, 1994 ; Watanabe et Uchida, 1996). Au niveau protéique, la CDA est très exprimée dans le foie et dans les neutrophiles matures et les cellules hépatiques (Micozzi *et al.*, 2014). Plusieurs facteurs semblent influencer le niveau d'expression de la CDA. L'ajout de vitamine D3 dans le milieu de culture provoque une augmentation de l'expression de la CDA dans certaines lignées (Watanabe et Uchida, 1996). Par ailleurs, la présence de polymorphismes de nucléotides (SNPs : « *single nucleotide polymorphisms* ») dans le promoteur de la CDA peut également être responsable d'une variation de

son niveau d'expression (Fitzgerald *et al.*, 2006). Enfin, le miR-484 semble capable de réguler négativement l'expression de la CDA dans des lignées de cancer du sein (Ye *et al.*, 2015).

4.3 CDA et drogues anti-cancéreuses

La capacité de la CDA à métaboliser certains ANs, affectant la réponse d'un patient donné à un traitement, a fait l'objet de nombreuses études, notamment dans le but de mieux comprendre les phénomènes de résistance à certaines drogues de chimiothérapie (pour revue : Serdjebi *et al.*, 2015).

Il existe un nombre très élevé de polymorphismes de la CDA (>1000, référence « ensemble »). Dans la partie codante du gène codant pour CDA, les plus décrits sont le 79A>C (à l'origine du variant CDA1), le 208G>A (à l'origine du variant CDA3) et le 435C>T (à l'origine d'une variation génétique muette) (Ludovini *et al.*, 2011 ; Maring *et al.*, 2010 ; Mercier *et al.*, 2009 ; Parmar *et al.*, 2011). Il existe également des polymorphismes au niveau du promoteur tels que les délétions -31delC et -92A>G (Parmar *et al.*, 2011 ; Mahlkecht *et al.*, 2009 ; Raynal *et al.*, 2010 ; Soo *et al.*, 2009 ; Sugiyama *et al.*, 2007) ou au niveau des introns tels que le polymorphisme 154 + 37G>A (Raynal *et al.*, 2010). L'ethnicité semble jouer un rôle majeur dans la distribution de ces polymorphismes (Yue *et al.*, 2003 ; Ueno *et al.*, 2009). Ces nombreuses variations dans la séquence de la CDA peuvent affecter son activité enzymatique. Par exemple, le variant CDA3 présente une activité cent fois plus faible que le variant classique de CDA (CDA2) et ce pour toutes les drogues testées (Baker *et al.*, 2013). Ainsi, sur la base de l'activité de la CDA, les patients peuvent être classés en trois groupes : les métaboliseurs lents (activité < 1,3 U/mg), les métaboliseurs rapides (activité > 6 U/mg) et les patients présentant une activité classique (Ciccolini *et al.*, 2010). En accord avec ces observations, une étude a mis en évidence que l'efficacité catalytique de la CDA est dépendante de la séquence codante pour la protéine mais aussi de la drogue métabolisée (De Pas *et al.*, 2000). Les variabilités existant dans la séquence codante de celle-ci vont ainsi induire des résultats cliniques différents pour les ANs métabolisés par la CDA. Ces derniers sont ❶ la gemcitabine, ❷ l'azacitidine, ❸ la cytarabine (Ara-C) et enfin ❹ la capecitabine (Figure 29) (pour revue : Serdjebi *et al.*, 2015).

❶ Parmi les analogues de pyrimidine, la gemcitabine est la drogue la plus utilisée, elle est ainsi le troisième agent anticancéreux prescrit dans le monde (Yardley, 2004 ; Sandler et Ettinger, 1999 ; Shelley *et al.*, 2012 ; Kroep *et al.*, 2000 ; Kim *et al.*, 2014). C'est un analogue de cytidine présentant deux atomes de fluor à la place des groupements hydroxyles du ribose. Après administration, la gemcitabine subit une série de phosphorylations par la dCK et la TK2 dans le but d'être incorporée dans l'ADN sous sa forme phosphorylée active : la dFdCTP (Mini *et al.*, 2006). Néanmoins, la plupart

des molécules de gemcitabine sont métabolisées par la CDA en un métabolite inactif : la dFdU avec un K_m égal à 96 μM (Serdjebi *et al.*, 2013). On estime ainsi que 90% de la gemcitabine administrée est désactivée par la CDA, cette valeur étant bien sûr influencée par l'activité de la CDA intrinsèque à chaque patient. Ainsi, l'inhibition chimique de la CDA par la THU associée à un traitement avec de la gemcitabine dans un modèle murin conduit à une diminution de la dFdU circulant et à une toxicité pouvant être létale (Ciccolini *et al.*, 2010). En outre, des corrélations entre l'absence d'activité de la CDA et une augmentation de l'apparition de toxicités hématologiques après administration de gemcitabine chez l'humain ont été rapportées (Giovannetti *et al.*, 2008 ; Ciccolini *et al.*, 2010, Mercier *et al.*, 2007, Farrell *et al.*, 2012). De façon intéressante, les patients avec une activité faible de la CDA présentent une meilleure réponse au traitement et une meilleure survie, probablement car l'efficacité de la gemcitabine est améliorée du fait de la diminution de son inactivation par la CDA (Tibaldi *et al.*, 2012). A l'inverse, les patients présentant une activité élevée de la CDA vont métaboliser plus rapidement la gemcitabine, diminuant ainsi l'efficacité du traitement. Des patients atteints d'un cancer du pancréas et présentant une activité forte de la CDA ($> 6 \text{ U/mg}$) ont en effet cinq fois plus de risques d'avoir une maladie qui progresse en comparaison aux autres patients (Serdjebi *et al.*, 2013).

② L'azacitidine et son dérivé « désoxy », la decitabine, sont également des analogues de cytidine. Leurs structures sont très proches de la cytidine, cependant ces deux molécules dérivent d'un noyau triazine au lieu d'un noyau pyrimidique. Elles agissent selon un mécanisme épigénétique en diminuant l'activité de la méthyltransférase DNMT-1 ce qui provoque une hypométhylation de l'ADN tumorale (Serdjebi *et al.*, 2014). Tout comme pour la gemcitabine, ces deux ANs sont rapidement désaminés par la CDA avec un K_m de l'ordre de 74 μM pour la decitabine (Micozzi *et al.*, 2014 ; De Pas *et al.*, 2000). Il existe peu de données concernant la réponse thérapeutique des patients traités avec ces deux ANs en fonction de l'activité de la CDA. Une étude a néanmoins montré qu'il existe une corrélation entre la diminution de l'activité de la CDA et une surexposition à ces ANs conduisant ainsi à une meilleure réponse des patients (Mahfouz *et al.*, 2013). A l'inverse, dans une autre étude, la déficience en CDA a été associée à une toxicité après administration d'azacitidine (Fanciullino *et al.*, 2013).

③ La cytarabine (Ara-C) est aussi un analogue de cytidine. Sa structure est identique à la cytidine hormis le ribose qui est remplacé par un arabinose. La dCK va également être responsable de sa phosphorylation ce qui produit la forme active : l'Ara-CTP. L'activité de l'Ara-C est également dépendante de l'activité enzymatique de la CDA qui catabolise sa désamination en un métabolite inactif. L'augmentation de la toxicité de l'Ara-C chez des patients présentant le polymorphisme

79A>C (CDA1) suggèrent que la CDA présentant ce polymorphisme métabolise moins bien l'Ara-C (Parmar *et al.*, 2011, Abraham *et al.*, 2012). De façon attendue, le traitement de patients présentant le variant CDA3 (qui possède une activité réduite) avec de l'Ara-C est corrélé à une forte sensibilité à cette dernière (Yue *et al.*, 2013 ; Xu *et al.*, 2012).

④ Contrairement aux autres ANs évoqués précédemment, la capecitabine dérive d'une base purique substituée par un ester, un fluor et un ribose. Il s'agit d'une forme orale du 5-FU développée pour être activée spécifiquement dans les tumeurs par la thymidine phosphorylase limitant ainsi la toxicité dans les cellules non tumorales (Schüller *et al.*, 2000). Une fois absorbée, la capecitabine subit une série de transformations dans le foie afin de libérer le 5-FU dans l'organisme. La CDA est responsable de la conversion de la 5'-désoxy-5-fluorocytidine (une molécule intermédiaire entre la capecitabine et le 5-FU) en 5'-désoxy-fluorouridine, favorisant ainsi la formation de 5-FU (Miwa *et al.*, 1998). Contrairement aux exemples précédents, la CDA joue donc un rôle dans l'activation de la capecitabine ; les conséquences d'une augmentation de l'activité de la CDA seront par conséquent opposées, conduisant ainsi à une sévère toxicité. Ainsi, plusieurs études ont décrit une corrélation entre l'activité élevée de la CDA et une toxicité après un traitement à base de capecitabine (Morita *et al.*, 2003 ; Mercier *et al.*, 2009 ; Caronia *et al.*, 2011).

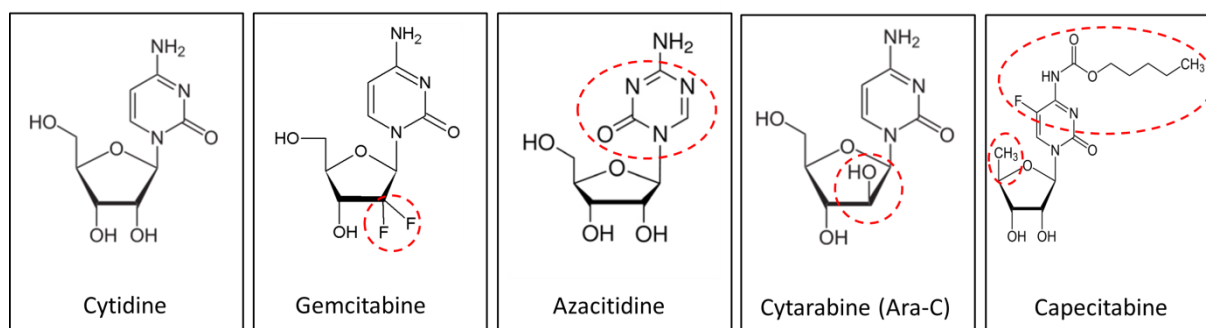


Figure 29 : Structure chimique de la cytidine et des ANs métabolisés par la CDA.

Ces exemples soulèvent l'importance de l'activité de la CDA dans les mécanismes de résistance ou de sensibilité aux traitements basés sur les ANs. Ces données suggèrent également que l'activité de la CDA doit être prise en compte lors de traitement avec des ANs afin d'adapter le traitement en fonction du polymorphisme de la CDA intrinsèque à chaque patient.

L'activité de la CDA pourrait également constituer une fenêtre thérapeutique dans le traitement des cancers. En effet, une étude récente a identifié cette dernière comme étant impliquée dans la conversion de certains nucléosides oxydés (Zauri *et al.*, 2015). Les nucléotides métabolisés via la voie

de « sauvetage » peuvent effectivement présenter des modifications épigénétiques. L'incorporation aléatoire dans l'ADN de tels nucléotides pré-modifiés peut avoir d'importantes implications pour la fidélité de l'épigénome et influencer ainsi sur le phénotype cellulaire. La 5-méthyle-2'-désoxycytidine (5mdC) constitue un exemple de nucléotides modifiés pouvant être incorporés dans l'ADN. Pour éviter cela, certaines enzymes de la voie de « sauvetage » vont prendre en charge la 5mdC prévenant de cette façon son incorporation dans l'ADN (Vilpo et Vilpo, 1993 ; Jekunen *et al.*, 1983 ; Jekunen et Vilpo, 1984). De manière surprenante, la CDA semble au contraire favoriser l'incorporation de nucléotides modifiés dans l'ADN. En effet, elle convertit la 5-hydroxyméthyle-2'-désoxycytidine (5hmdC) et la 5-formy-2'-désoxycytidine (5fdC) en leurs équivalents « uridine » qui seront ensuite incorporés dans l'ADN ce qui entraîne des dommages et finalement la mort cellulaire. En accord avec ces résultats, le traitement de cellules sur-exprimant la CDA avec la 5hmdC et la 5fdC induit une mortalité cellulaire (Zauri *et al.*, 2015). Les auteurs de cette étude ont alors suggéré qu'il était possible de traiter certains cancers, tels que les cancers du pancréas qui présentent une surexpression de la CDA et une résistance aux ANs, avec ces bases modifiées, ouvrant une nouvelle fenêtre thérapeutique établie sur l'expression de la CDA.

4.4 CDA et syndrome de Bloom

Une étude menée au laboratoire a permis d'identifier pour la première fois la CDA comme étant impliquée dans une pathologie humaine : le syndrome de Bloom. En effet, nous avons démontré que l'activité de la CDA était nécessaire pour prévenir certains aspects du phénotype Bloom (Chabosseau *et al.*, 2011; Gemble *et al.*, 2015).

Comme évoqué précédemment (*cf. chapitre 1*), le syndrome de Bloom résulte de la mutation des deux copies du gène *BLM* codant pour l'hélicase RecQ du même nom. L'absence d'expression de BLM dans des fibroblastes issus de patients Bloom (lignées BS) est corrélée à une diminution drastique de l'ARNm de la CDA et de l'expression de la protéine associée, suggérant ainsi une régulation au niveau transcriptionnel. A l'inverse, la réexpression d'une protéine BLM fonctionnelle permet de restaurer l'expression de la CDA. De manière intéressante, la déplétion en BLM induit également la diminution de l'expression de la CDA en dehors du contexte Bloom et ce dans différentes lignées cellulaires testées. De plus, il est important de noter que l'activité hélicase de BLM est nécessaire pour restaurer l'expression de la CDA. Enfin, le clonage du promoteur de la CDA en amont du gène luciférase a révélé que l'absence d'une protéine BLM fonctionnelle réduit de moitié

son activité, confirmant une régulation au niveau transcriptionnel. *Le mécanisme moléculaire précis de la régulation de la CDA par BLM constitue actuellement un axe de recherche au laboratoire.*

D'un point de vue fonctionnel, la perte d'expression de la CDA conduit à un déséquilibre du pool de pyrimidines relatif, se traduisant par une augmentation d'un facteur 2 de la concentration en dCTP et par une diminution faible mais significative de la quantité de dTTP, altérant donc le ratio dCTP/dTTP. L'expression d'une protéine CDA dans des lignées BS permet de restaurer la quantité de dCTP à un niveau comparable à celui observé dans les cellules exprimant BLM, démontrant que c'est bien l'absence de la CDA qui est à l'origine du déséquilibre du pool de pyrimidines.

Au niveau cellulaire, la réexpression d'une protéine CDA dans des lignées BS permet de prévenir certains aspects du phénotype Bloom. Ainsi, le taux de SCEs diminue d'environ 25% et la vitesse de progression des fourches de réplication revient à un niveau comparable à celui observé dans des cellules exprimant BLM. A l'inverse, la déplétion en CDA dans des cellules exprimant BLM induit une augmentation du taux de SCEs et un ralentissement de la vitesse de progression des fourches de réplication. Enfin, de façon intéressante, il est possible de reproduire ou de prévenir ces phénotypes en jouant directement sur le pool de nucléotides. Ainsi, l'ajout de dC (le substrat de la CDA) dans le milieu extracellulaire de cellules exprimant BLM/CDA permet d'augmenter la concentration en dCTP et d'induire une augmentation du taux de SCEs ainsi qu'un ralentissement de la vitesse des fourches de réplication. A l'inverse, l'ajout de dU (le produit de la CDA) dans le milieu extracellulaire de cellules BS permet de réduire le taux de SCEs et rétablit la vitesse des fourches de réplication.

L'ensemble de ces données révèle que c'est l'absence d'expression de la CDA et le déséquilibre du pool de pyrimidines qui en découle qui sont à l'origine d'une partie de l'augmentation du taux de SCEs et de la totalité du ralentissement de la progression des fourches de réplication observés dans le syndrome de Bloom (Figure 30). Ces résultats démontrent ainsi pour la première fois que certains aspects du phénotype Bloom ne sont pas la conséquence directe (mais indirecte) de la perte d'activité de BLM. Cela implique que beaucoup des résultats obtenus après déplétion de BLM doivent être réétudiés en prenant en compte l'absence de la CDA et le déséquilibre du pool de pyrimidines subséquent. C'est également la première fois que la CDA est décrite comme impliquée dans le phénotype d'une pathologie humaine.

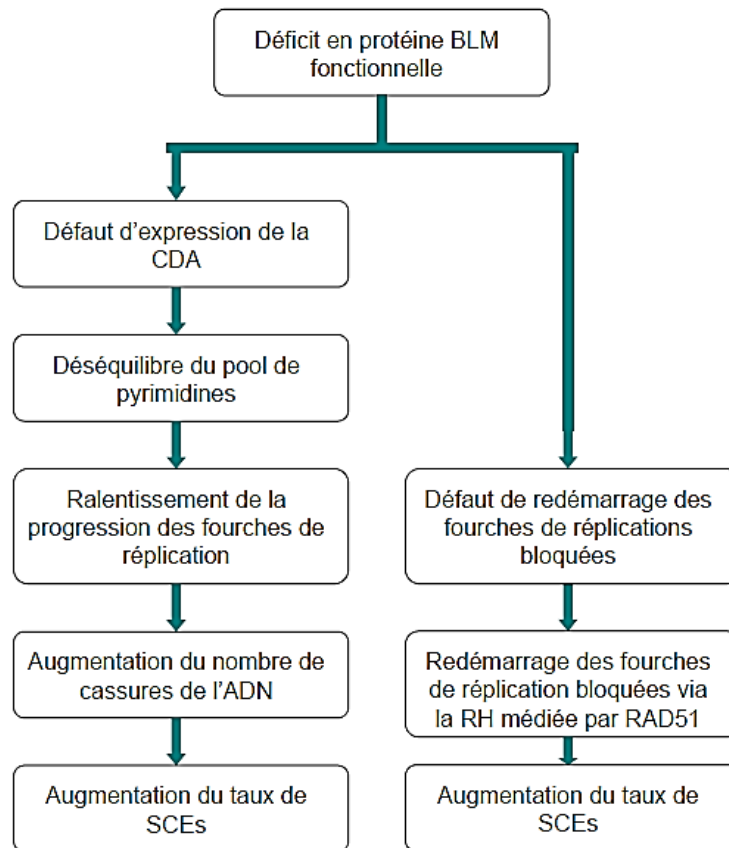


Figure 30 : Schéma des conséquences de l'absence d'une protéine BLM fonctionnelle dans le phénotype BS.

Au cours de mon projet de thèse, j'ai montré que la déficience en CDA et le déséquilibre du pool de pyrimidines qui en découle sont également à l'origine d'une diminution de l'activité d'une protéine de la famille des PARPs appelée PARP-1. En conséquence, cette famille de protéines, et en particulier PARP-1, feront l'objet du chapitre suivant.

3

PARP-1, une enzyme multifonctionnelle

Des réponses cellulaires rapides et appropriées sont nécessaires lors d'un stress afin de maintenir la stabilité du génome. Les modifications post-traductionnelles permettent la transduction rapide d'un signal et conduisent à des effets biologiques variés. La poly(ADP-ribose) polymérase 1 ou PARP-1 est une enzyme clé de la cellule dont la majorité des fonctions est médiée par la synthèse de polymères d'ADP-ribose (PAR) (pour revues : Luo et Kraus, 2012 ; Kalisch *et al.*, 2012). Ainsi, via cette activité de PARylation, PARP-1 est impliquée dans une grande variété de fonctions allant de la réparation de l'ADN à la régulation de l'expression de gènes, en passant par le remodelage de la chromatine et la régulation de la réponse inflammatoire. La famille des PARPs, et en particulier la protéine PARP-1 ainsi que son rôle dans le maintien de la stabilité du génome, seront présentés dans ce troisième et dernier chapitre de l'introduction.

1. La famille des PARPs

Les PARPs constituent une famille de protéines participant au maintien de l'homéostasie cellulaire. Des homologues de cette famille existent dans une grande variété d'organismes eucaryotes. De manière surprenante, il n'existe pas d'homologues de la famille PARP chez les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe* (Otto *et al.*, 2005 ; Citarelli *et al.*, 2010 ; pour revue Hassa *et al.*, 2006). Chez l'homme, cette famille comprend 17 membres (Hottiger *et al.*, 2010) qui possèdent un large éventail de fonctions principalement liées à la réparation de l'ADN mais également impliquées dans la régulation de la transcription ou dans la prise en charge de l'ARN (pour revue : Bai, 2015).

Les PARPs sont caractérisées biochimiquement par leur activité de transfert d'ADP-ribose (prédite ou connue). En utilisant une molécule de NAD^+ comme substrat, les PARPs vont ainsi lier de manière covalente un polymère d'ADP-ribose (PAR) chargé négativement sur des protéines cibles, il s'agit de la Poly-ADP-Ribosylation (PARylation) (pour revue : Gibson et Kraus, 2012).

1.1 Domaines et rôles

Les 17 protéines humaines de la famille PARP ont été identifiées sur la base d'une homologie avec la protéine PARP-1 et via la présence d'un domaine commun à tous les membres de cette famille : le domaine PARP (en vert, figure 31), comprenant la signature PARP (en vert foncé, figure 31), une séquence protéique hautement conservée permettant la liaison du NAD^+ . Ce domaine confère à la famille PARP son activité de synthèse de PAR caractéristique. *Le domaine PARP ainsi que son activité enzymatique seront détaillés dans la section 1.2.1.*

Sur la base de leurs structures et de la présence de certains domaines, les PARPs ont été classées selon cinq sous-familles (Hassa et Hottiger, 2008 ; Schreiber *et al.*, 2006).

1.1.1 Les PARPs dépendantes de l'ADN :

Cette famille contient les protéines PARP-1, PARP-2 et PARP-3 qui sont localisées dans le noyau. Elles sont toutes caractérisées par leur activation par des structures d'ADN discontinues (Boehler *et al.*, 2011 ; Yélamos *et al.*, 2008 ; Hassler et Ladurner, 2012, Amé *et al.*, 1999) et par la présence d'un domaine WGR situé dans la partie C-terminale (en rose, figure 31) (Krishnakumar et Kraus, 2010). PARP-1 et PARP-2 possèdent un domaine de liaison à l'ADN dans leurs parties N-terminales (en orange, figure 31) (Rouleau *et al.*, 2010 ; Li et Chen, 2014) contrairement à PARP-3, bien que celle-ci soit capable d'interagir avec l'ADN *in vitro* (Rouleau *et al.*, 2007, Rulten *et al.*, 2011).

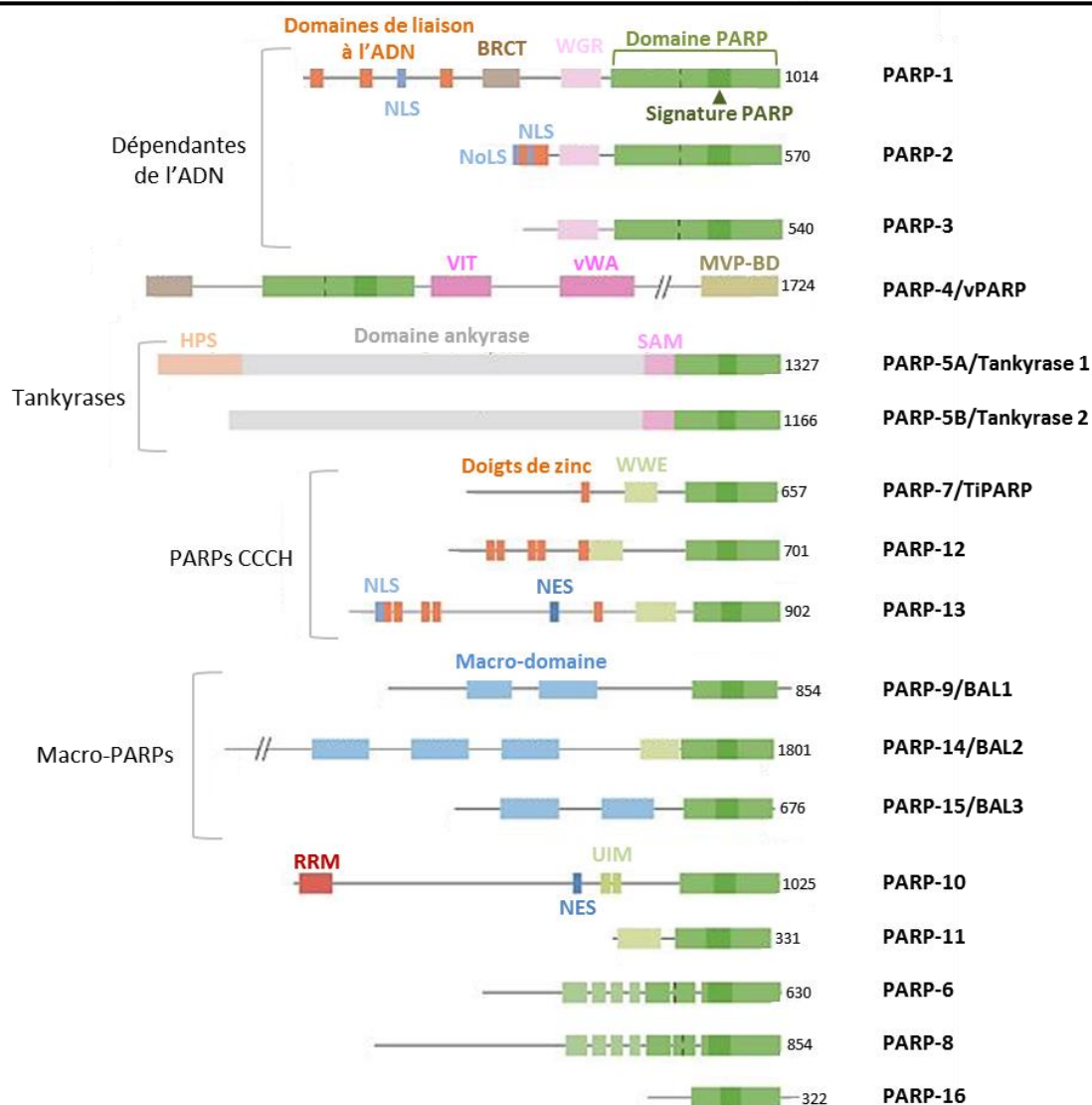


Figure 31 : Représentation des différents domaines des PARPs.

La sous-famille de chaque PARP est indiquée à droite suivie par une représentation schématique des domaines de chaque protéine. La taille en acides aminés et le nom des différents membres de la famille des PARPs sont indiqués à droite. BRCT : BRCA1-carboxy-terminus; HPS : homopolymeric runs of His, Pro and Ser; NLS : Nuclear localization Signal; NoLS : Nucleolar Localization Signal; NES : Nuclear Export Signal; MVP-BD : MVP-binding; RRM : RNA-binding motif; SAM, sterile α -motif; UIM : ubiquitin-interacting motif; VIT : vault inter- α -trypsin; vWA : von Willebrand factor type A; WGR : conserved W, G and R residues; WWE : conserved W, W and E residues (adapté de Hakmé *et al.*, 2008 et Li et Chen, 2014).

PARP-1 est le membre le mieux caractérisé de la famille des PARPs. Son implication dans la voie de réparation des dommages de l'ADN est primordiale. Elle est ainsi nécessaire à la réparation des CSBs par le SSBR (« *single-strand break repair* ») et à la réparation par excision de base (BER) notamment via sa capacité à recruter XRCC1 (« X-ray repair cross-complementing protein 1 ») aux

sites de dommages de l'ADN (Parsons *et al.*, 2005). PARP-1 est également impliquée dans le NHEJ, elle interagit notamment avec des protéines de réparation des CDBs telles que Ku et DNA-PKc (Kraus, 2008 ; Li *et al.*, 2004 ; Ruscetti *et al.*, 1998). Cependant, les fonctions de PARP-1 ne se limitent pas à la réparation de l'ADN. Effectivement, elle est également impliquée dans le vieillissement, la protection antivirale, la régulation du cycle cellulaire, le remodelage de la chromatine, la différenciation, l'inflammation, la régulation du métabolisme, la dégradation par le protéasome ou encore la régulation transcriptionnelle (pour revues : Bai, 2015 ; Ji et Tulin, 2013 ; Bai et Canto, 2012 ; Rosado *et al.*, 2013 ; Virág et Szabó, 2002 ; De Vos *et al.*, 2012).

Etant donné l'importance de PARP-1 dans mon projet, ses fonctions seront détaillées dans une section indépendante, plus loin dans ce chapitre.

Manipulation génétique	Viabilité	Phénotypes du modèle	Références
Parp-1 -/-	Viable	Augmentation de la sensibilité aux radiations ionisantes, agents génotoxiques et stress environnementaux. Défauts dans la réparation des dommages de l'ADN.	Wang et al. 1995, 1997; Menissier de Murcia et al. 2003
		Résistance à la mort cellulaire médiée par des agents endommageant l'ADN	Yu et al. 2002; Zong et al. 2004
		Résistance à l'inflammation dans différents modèles	Oliver et al. 1999; Mabley et al. 2001
		Augmentation de la formation de tumeurs induites chimiquement dans certains modèles tumoraux	Masutani et al. 2005
		Augmentation de la fréquence de lymphome T dans un fond SCID (mutation de la sous-unité catalytique de DNA-PKc)	Morrison et al. 1997
		Augmentation de la fréquence de tumeurs spontanées dans un fond p53 -/- (délétion de l'exon 2 de Parp-1) ou Augmentation de la latence de formation des tumeurs dans un fond p53 -/- (délétion de l'exon 4 de Parp-1)	Tong et al. 2001 Conde et al. 2001
Parp-2 -/-	Viable	Augmentation de la sensibilité aux radiations ionisantes et aux agents génotoxiques	Menissier de Murcia et al., 2003
Parp-1 -/- Parp-2 -/-	Létalité embryonnaire (avant E8.0)	Anomalies du développement et retard sévère de la croissance	Menissier de Murcia et al., 2003
Parp-3 -/-	Viable	Pas de sensibilité aux radiations ionisantes	Boehler et al., 2011
Parp-1 -/- Parp-3 -/-	Viable	Augmentation de la sensibilité aux radiations ionisantes	

Tableau 8 : Phénotypes associés aux modèles murins déplétés pour Parp-1 à Parp-3 (sur la base des données de Kim et al, 2005 ; Boehler *et al.*, 2011).

Les modèles murins déplétés pour Parp-1 sont viables mais présentent néanmoins des anomalies principalement liées à la réparation de l'ADN, variables en fonction des études (Tableau 8). De manière intéressante, les modèles murins déplétés à la fois pour Parp-1 et Parp-2 présentent une létalité embryonnaire, suggérant un rôle complémentaire de ces deux enzymes. En effet, PARP-2 possède de nombreuses similarités fonctionnelles avec PARP-1. Par exemple, il s'agit également d'une enzyme importante dans la réponse aux dommages de l'ADN qui s'accumule aux sites de

dommages (Chalmers *et al.*, 2004) avec une cinétique plus faible que PARP-1 mais avec une persistance plus longue (Mortusewicz *et al.*, 2007). Elle se lie préférentiellement sur des « *gaps* » d'ADN d'un seul nucléotide et participe à la réparation des CSBs en particulier au BER (Schreiber *et al.*, 2002). Elle interagit ainsi avec de nombreuses protéines importantes pour ce mécanisme telles que XRCC1, PARP-1, DNA pol β et la DNA ligase III (Schreiber *et al.*, 2002). PARP-2 interagit également avec l'hétérodimère Ku (Yélamos *et al.*, 2008) et les cellules déficientes en PARP-2 présentent une accumulation de CDBs (Nicolás *et al.*, 2010), suggérant ainsi qu'elle pourrait aussi agir lors de la réparation de ce type de cassures.

PARP-2 se localise sur certaines séquences spécifiques des chromosomes. Elle interagit ainsi avec les protéines CENPA (« *kinetochore protein centromere A* »), CENPB (« *kinetochore protein centromere B* ») et BUB3 en prométaphase et en métaphase, ce qui conduit à son recrutement aux centromères (Saxena *et al.*, 2002). Les événements induisant une perturbation de la dynamique des microtubules entraînent l'accumulation de PARP-2 aux centromères ce qui suggère qu'elle pourrait participer à la ségrégation correcte des chromosomes (Dantzer *et al.*, 2006). De plus, au niveau des télomères, PARP-2 régule négativement TRF2 et son absence induit des cassures chromosomiques et un raccourcissement des télomères (Dantzer *et al.*, 2004).

Enfin, la déplétion de PARP-2 affecte l'expression de nombreux gènes ce qui suggère un rôle dans la transcription (Bai *et al.*, 2007 ; Bai *et al.*, 2011 ; Maeda *et al.*, 2006). Elle est ainsi impliquée dans la compaction de la chromatine, un facteur important pour la transcription, via la régulation du facteur de transcription TIF-1 β (« *transcriptional intermediary factor* ») et de la protéine HP-1 α (« *heterochromatin protein* ») (Quenet *et al.*, 2008). PARP-2 interagit également avec différents acteurs modulant la transcription tels que les topoisomérases I et II β (Meyer-Ficca *et al.*, 2011 ; Malanga et Althaus, 2004) primordiales pour le réarrangement de l'ADN, ou bien tels que la nucleophosmin/B23 (Meder *et al.*, 2005) qui module la transcription de l'ARNr (Derenzini, 2000). Enfin, PARP-2 peut réguler directement l'activité de certains facteurs de transcription (Popoff *et al.*, 2002 ; Phulwani et Kielian, 2008 ; Brunyanski *et al.*, 2010 ; Szanto *et al.*, 2012).

D'autres rôles de PARP-2 ont aussi été décrits, notamment dans le remodelage de la chromatine et la maintenance du génome durant la spermatogénèse, la régulation de la réponse inflammatoire, la réponse au stress oxydant ou encore la régulation du métabolisme cellulaire (pour revue : Szanto *et al.*, 2012).

Des données récentes ont propulsé PARP-3 en tant que nouvelle venue dans la réparation des CDBs (Rulten *et al.*, 2011 ; Boehler *et al.*, 2011). PARP-3 est ainsi recrutée aux sites des dommages de l'ADN après micro-irradiation laser. Sa déplétion dans des cellules humaines conduit à une cinétique

de réparation des CDBs ralentie. De façon intéressante, la déplétion de Parp-1 et Parp-3 dans des modèles murins augmente significativement la radiosensibilité des cellules, suggérant que les deux protéines agissent ensemble dans la réparation des CDBs (Boehler *et al.*, 2011). Des études récentes ont ainsi identifiées PARP-3 comme étant un régulateur de la protéine APLF (« *aprataxin and PNK-like factor* »). En effet, l'inhibition de PARP-3 perturbe le recrutement de cette dernière et sa phosphorylation sur la S116 par ATM. Il a donc été proposé que PARP-3 favoriserait le recrutement et l'activation d'APLF aux sites de CDBs (Rulten *et al.*, 2011 ; Fenton *et al.*, 2013), selon un mécanisme similaire au recrutement d'APLF au sites de CSBs par PARP-1 (Ahel *et al.*, 2008). Le recrutement du complexe XRCC4-DNA ligase IV qui en découle faciliterait la ligation de l'ADN durant le NHEJ classique. PARP-3 pourrait également stimuler la voie alternative du NHEJ via son interaction avec XRCC1, la DNA ligase III et PARP-1 et via sa capacité à stimuler l'activité de PARP-1 (Rouleau *et al.*, 2007).

Enfin, PARP-3 est également capable de réguler le cycle cellulaire, en particulier la progression mitotique en stimulant PARP-5A, elle-même responsable de la PARylation du facteur mitotique NUMA (« *nuclear mitotic apparatus protein* ») (Boehler *et al.*, 2011).

1.1.2 Les tankyrases :

Ce groupe inclut PARP-5A (ou tankyrase 1) et PARP-5B (ou tankyrase 2) très proches au niveau structural. Elles sont caractérisées par un large domaine ankyrine (ANK) (en gris, figure 31) qui permet des interactions protéines-protéines et facilite la sélection de cibles et leur activation, ainsi que par un domaine SAM (« *sterile α -motif* ») requis pour l'homo- ou l'hétérodimérisation. PARP-5B se distingue de PARP-5A par la présence d'un domaine HPS (pour His-Pro-Ser) dont la fonction reste inconnue (Hsiao et Smith, 2008; Sbodio *et al.*, 2002 ; Li et Chen, 2014).

Les tankyrases sont connues pour avoir diverses fonctions dans la cellule via le ciblage de différents substrats pour la PARylation. Elles ont été décrites pour la première fois pour leur capacité à affecter les télomères en PARylant la protéine TRF1 qui régule négativement l'extension des télomères. La PARylation de TRF1 stimule sa dégradation par le protéasome, promouvant ainsi l'extension des télomères (Smith *et al.*, 1998 ; Smith et de Lange, 2000). Les tankyrases sont également impliquées au cours de la mitose ; PARP-5A PARyle NUMA, ce qui permet de réguler la cohésion des chromatides sœurs (Chang *et al.*, 2005). Elle peut également PARyler Miki, promouvant ainsi la progression en prométaphase (Ozaki *et al.*, 2012).

Récemment, les tankyrases ont été identifiées comme des cibles potentielles pour le traitement de certains cancers (Riffell *et al.*, 2012). En effet, elles sont capables de PARyler l'Axine et de

promouvoir sa dégradation dépendante du protéasome, inhibant ainsi l'activation de la voie Wnt (Huang *et al.*, 2013 ; Zhang *et al.*, 2011), qui est suractivée dans certains cancers (pour revue : Stewart, 2014). De plus, des données *in vivo* ont montré que l'utilisation d'un inhibiteur de tankyrase, le XAV939, permet d'inhiber la voie Wnt en stabilisant le complexe Axines 1/2 (Huang *et al.*, 2009). Cette étude suggère donc une possible utilisation thérapeutique de ces inhibiteurs pour traiter des cancers présentant une sur-activation de la voie Wnt (Riffell *et al.*, 2012 ; Kamal *et al.*, 2014).

1.1.3 Les PARPs CCCH :

Le groupe des PARPs CCCH (pour Cys-Cys-Cys-His) est composé de PARP-7 (ou TIPARP), PARP-12, et PARP-13. Il est caractérisé par la présence de deux domaines spécifiques : un domaine CCCH en « doigt de zinc » (en orange) capable de se lier à l'ARN et un domaine WWE présentant une affinité pour les PAR (en vert pâle, figure 31) (Li et Chen, 2014).

Ce groupe de PARPs est très peu étudié et les fonctions de PARP-7, 12 et 13 ne sont pas clairement définies. Néanmoins, quelques données existent concernant ces protéines. PARP-7 co-localise avec le récepteur AHR (« *aryl hydrocarbon receptor* ») dans le noyau où elle va réprimer son expression (MacPherson *et al.*, 2013). Quant à PARP-12, elle pourrait réguler la réplication du virus VEEV (« *Venezuelan equine encephalitis virus* ») (Atasheva *et al.*, 2012). Il est important de noter que PARP-13 est la seule PARP qui n'est pas active enzymatiquement. De façon étonnante, l'étude récente de sa structure cristallographique a révélé que son site actif présente une conformation fermée qui ne permet pas la liaison du NAD⁺ (Karlberg *et al.*, 2015), ce qui explique son absence d'activité de PARylation. L'expression d'une protéine PARP-13 tronquée au niveau du domaine PARP conduit néanmoins à l'inhibition de l'accumulation d'ARN viral (Gao *et al.*, 2002). Ce résultat peut s'expliquer par la capacité de PARP-13 à interagir à la fois avec l'ARN et avec le complexe exosome, responsable de la dégradation des ARN viraux. PARP-13 pourrait ainsi créer une interface entre l'exosome et l'ARN viral entraînant la dégradation de ce dernier et une réplication inefficace des virus (Guo *et al.*, 2004). PARP-13 interagit aussi avec RIG-1, impliquée dans la réponse immunitaire suite à une infection virale (Hayakawa *et al.*, 2011).

Les CCCH-PARPs demeurent, à l'heure actuelle, un groupe de protéines peu comprises.

1.1.4 Les Macro-PARPs :

Les macro-PARPs sont PARP-9 (ou BAL1), PARP-14 (ou BAL2) et PARP-15 (ou BAL3) et sont nommées ainsi car elles possèdent des macro-domaines (en bleu, figure 31). Ces macro-domaines

comprennent notamment un module de liaison aux PAR facilitant le recrutement de ces PARPs au niveau des sites de PARylation (Li et Chen, 2014).

Cette sous-famille de PARPs semble principalement impliquée dans la régulation transcriptionnelle. Des données montrent que PARP-9 est un modulateur de la transcription dans les cellules de lymphomes B (Juszczynski *et al.*, 2006). Plus récemment, PARP-9 et son partenaire BBAP, une E3 ubiquitine ligase, ont été décrits comme participant à la réponse aux dommages de l'ADN via l'ubiquitination de protéines clés telles que BRCA1 et 53BP1 et en stimulant leur recrutement aux sites de CDBs (Yan *et al.*, 2013). PARP-14 semble également réguler la transcription. En effet, elle interagit avec STAT6 et stimule son activité transcriptionnelle (Mehrotra *et al.*, 2011). PARP-14 joue un rôle dans la physiologie des lymphocytes via ses interactions avec l'IL-4 (« *interleukin 4* ») (Cho *et al.*, 2009). Enfin, PARP-15 peut lier des monomères ou des PAR (Venkannagari *et al.*, 2013),

1.1.5 Les « autres PARPs » :

Les autres membres de la famille PARP présentent des domaines qui ne sont pas partagés avec les sous-familles évoquées précédemment et ne sont donc pas intégrés à un groupe particulier. Ces protéines forment les « autres PARPs ».

Parmi cette sous-famille, PARP-14 (vPARP) est un composant du « vault », un complexe ribonucléoprotéique de 13 MDa présent dans le cytoplasme des cellules (Raval-Fernandes *et al.*, 2005). De façon intéressante, les souris déficientes pour Parp-14 montrent une augmentation des tumeurs induites par des carcinogènes (Raval-Fernandes *et al.*, 2005) ce qui suggère que Parp-14 pourrait avoir un rôle de suppresseur de tumeur. PARP-6 est capable d'inhiber la prolifération cellulaire (Tuncel *et al.*, 2012). PARP-10 interagit avec C-MYC et l'inhibe (Yu *et al.*, 2005). PARP-16 régule négativement le niveau protéique de la karyophérine- β 1 et promeut la PARylation de PERK et IRE1 α nécessaire à leur activation durant un stress du réticulum endoplasmique (Di Paola *et al.*, 2012 ; Jwa et Chang, 2012). Enfin, PARP-8 et PARP-11 possèdent bien une activité de PARylation mais leurs fonctions demeurent peu connues (Scarpa *et al.*, 2013).

En dehors de ces quelques données, cette classe de PARPs demeure très peu décrite.

La famille des PARPs comprend donc un grand nombre de protéines impliquées dans un large panel de fonctions. La plupart de ces protéines (hormis PARP-1 et 2) ne sont pas encore clairement caractérisées et leurs rôles précis dans la cellule restent peu compris (pour revue : Bai, 2015) (Tableau 9). Néanmoins, toutes ces protéines sont définies par une activité enzymatique commune, qu'elle soit prédite ou connue.

Noms	Localisation cellulaire	Processus biologiques	Références
PARP-1	Nucléaire	Vieillessement, rôle antiviral, régulation du cycle cellulaire, structure des chromosomes, différenciation, réparation de l'ADN, inflammation, régulation du métabolisme, dégradation par le protéasome, régulation des ARNs, transcription	Ji et Tulin, 2013; Bai et Canto, 2012; Rosado et al., 2013; Virag et Szabo, 2002; Cho-Park et Steller, 2013; De Vos et al., 2012
PARP-2	Nucléaire	Structure des chromosomes, réparation de l'ADN, régulation du cycle cellulaire, inflammation, régulation métabolique, transcription	Szanto et al., 2012; Farrés et al., 2014
PARP-3	Nucléaire	Régulation du cycle cellulaire, Réparation de l'ADN	De Vos et al., 2012
PARP-4 (vPARP)	Nucléaire, exosomes, membrane cellulaire, fuseau	Biologie des cancers, biologie du « vault »	Raval-Fernandes et al., 2005
PARP-5a (TNK1)	Nucléaire, télomérique, Golgi, cytoplasmique	Rôle antiviral, régulation du cycle cellulaire, régulation de l'ARN cytoplasmique, inflammation, régulation métabolique, formation du fuseau mitotique, maintenance des télomères	Riffel et al., 2012; Rosado et al., 2013
PARP-5b (TNK2)	Nucléaire, télomérique, Golgi, cytoplasmique	Inflammation, régulation métabolique, maintenance des télomères (?)	Riffel et al., 2012; Rosado et al., 2013
PARP-6	Cytoplasmique ?	Prolifération cellulaire	
PARP-7 (TiPARP)	Nucléaire (?); cytoplasmique (?)	Rôle antiviral, régulation de l'ARN cytoplasmique, transcription	Ji et Tulin, 2013
PARP-8	Inconnu	Inconnu	
PARP-9	Nucléaire, cytoplasmique (?) ; membrane cellulaire	Migration cellulaire, tumorigénèse	Feijs et al., 2013
PARP-10	Nucléaire (?); cytoplasmique (?)	Prolifération cellulaire, transcription, régulation de l'ARN cytoplasmique, rôle antiviral	Ji et Tulin, 2013
PARP-11	Inconnu	Inconnu	
PARP-12	Cytoplasmique	Rôle antiviral, régulation de l'ARN cytoplasmique	Leung et al., 2012
PARP-13	Cytoplasmique	Régulation de l'ARN cytoplasmique	Leung et al., 2012
PARP-14	Nucléaire , membrane cellulaire	Inflammation, régulation métabolique, régulation de l'ARN nucléaire, transcription, tumorigénèse	Cho et al., 2009; Rosado et al., 2013
PARP-15	Cytoplasmique	Régulation de l'ARN cytoplasmique, tumorigénèse	Cho et al., 2009, Ji et Tulin, 2013
PARP-16	Membrane cellulaire, réticulum endoplasmique	Réponse aux protéines mal repliées	Jwa et Chang, 2012

Tableau 9 : Liste des fonctions des PARPs et de leurs localisations (d'après Bai, 2015).

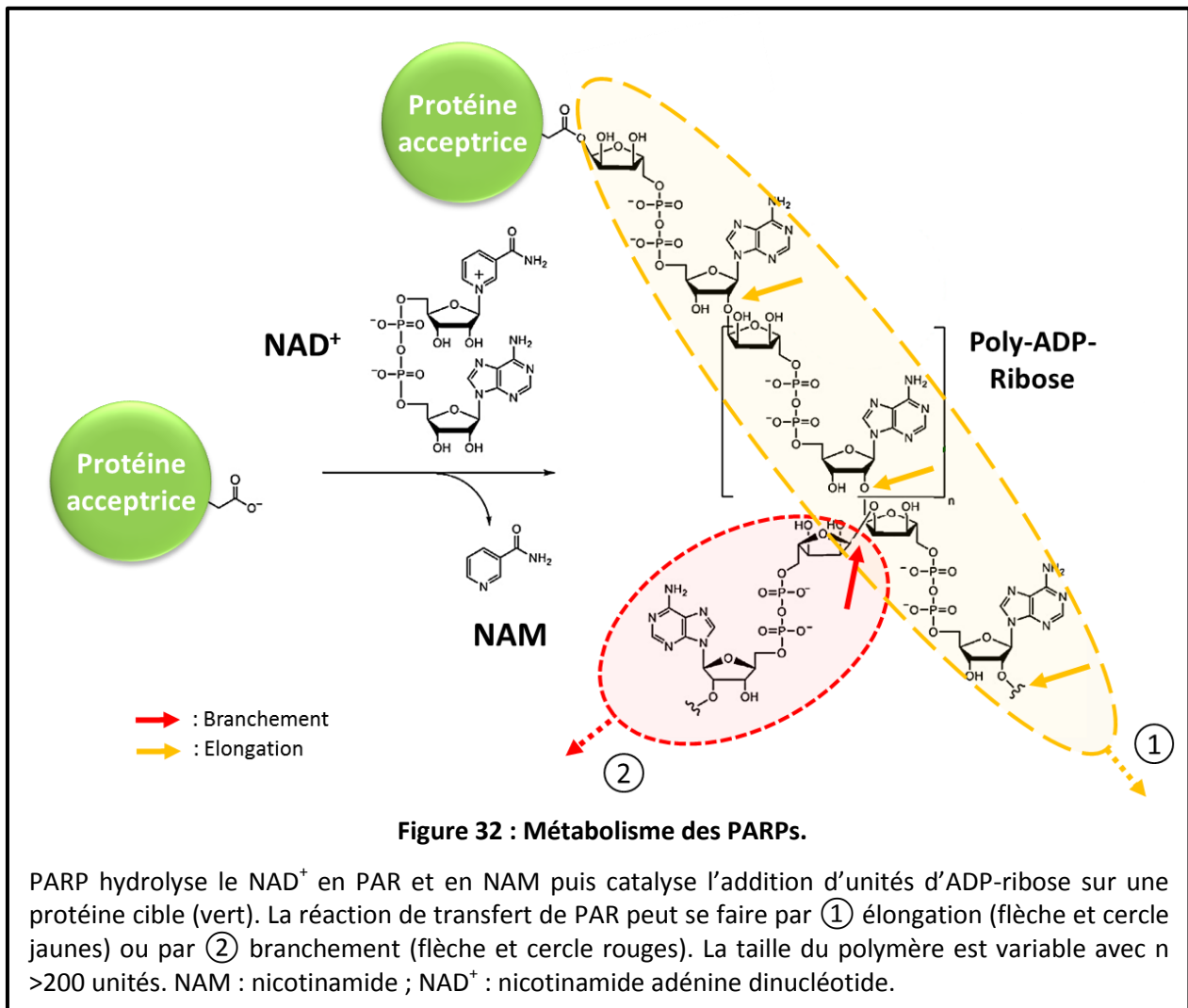
1.2 Métabolisme de l'ADP-ribose

La synthèse d'ADP-ribose a été décrite pour la première fois il y a plus de 50 ans (Chambon *et al.*, 1963). Plusieurs décennies plus tard, du fait de sa composition chimique, le PAR fut initialement décrit comme le « troisième type d'acides nucléiques » (D'Amours *et al.*, 1999).

1.2.1 Réaction de synthèse de l'ADP-ribose

L'activité enzymatique des PARPs est localisée dans le domaine PARP (en vert, figure 31) commun à toutes les protéines de cette famille. La réaction catalysée par les PARPs comprend deux étapes. D'abord, la fixation et le clivage du NAD⁺ qui génèrent deux produits : une molécule de nicotinamide (NAM) et une molécule d'ADP-Ribose par molécule de NAD⁺ métabolisée (Figure 32).

L'énergie produite par ce clivage est ensuite utilisée par les PARPs pour catalyser la synthèse du PAR et sa liaison covalente à des protéines cibles par l'intermédiaire de résidu lysine ou bien via le groupement carboxyle de résidus glutamine ou aspartate (D'Amours *et al.*, 1999).



Du fait de ses charges négatives, l'ADP-ribose va altérer les propriétés biologiques des protéines modifiées ou interagissant avec lui, en modulant leurs structure, fonction et localisation (Schreiber *et al.*, 2006 ; Krishnakumar et Kraus, 2010).

A l'échelle moléculaire, la réaction de synthèse du PAR se fait au niveau d'un repliement protéique présent dans la partie catalytique du domaine PARP (pour revue : Barkauskaite *et al.*, 2015). Ce repliement va positionner le NAD⁺ selon une orientation particulière du nicotinamide par rapport au groupement ribose (Ruf *et al.*, 1998). Cette orientation est rendue possible par un résidu histidine et un résidu tyrosine hautement conservés entre les ADP-Ribosyle transférases enzymatiquement actives. Les résidus histidine et tyrosine sont respectivement cruciaux pour les

positionnements des groupements A-ribose et N-ribose du NAD^+ dans une conformation permettant la réaction de PARylation (Otto *et al.*, 2005 ; Bell et Einsenberg, 1996). En plus de ces deux résidus, un résidu glutamine est nécessaire à la synthèse et à la liaison d'une unité supplémentaire d'ADP-ribose sur la protéine acceptrice. Ces trois résidus forment le trio « H-Y-E » (pour Histidine-Tyrosine-Glutamine) essentiel à l'activité enzymatique optimale des PARPs (Figure 33) (Kleine *et al.*, 2008).

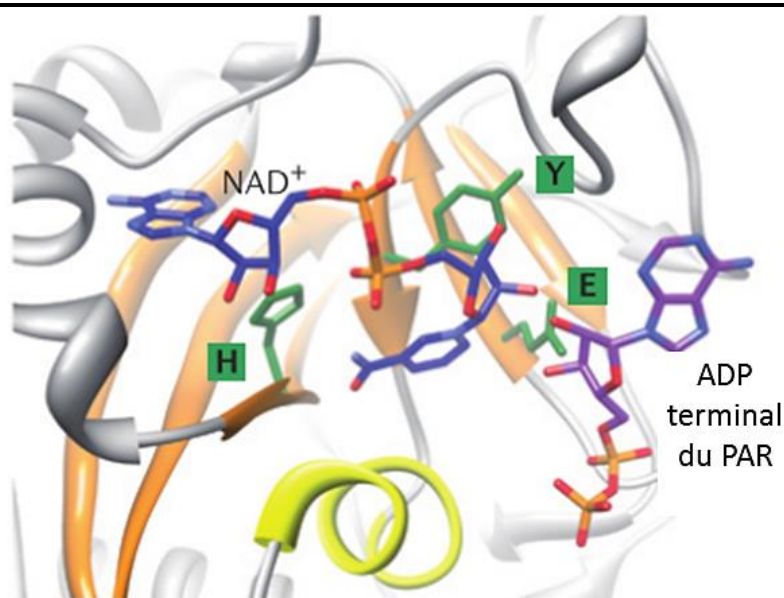


Figure 33 : Mécanisme d'élongation du poly-ADP-ribose.

Les feuillets β et les hélices α du domaine PARP sont indiqués respectivement en orange et en jaune, avec les résidus conservés H-Y-E (His-Tyr-Glu) en vert. Le résidu Glu est nécessaire à la réaction d'élongation du PAR. Le NAD^+ est en bleu alors que le PAR est en violet, les phosphates sont en orange (d'après Gibson et Kraus, 2012).

Le PAR peut ensuite être généré selon deux types de réactions, en promouvant soit l'élongation soit le branchement. La réaction d'élongation (① de la figure 32) permet la formation d'un pont $\alpha(1 \rightarrow 2)$ O-glycosidique entre le ribose proximale d'une adénine (A-ribose) et la chaîne du polymère tandis que la réaction de branchement (② de la figure 32) consiste à créer une liaison entre deux riboses proximales (N-ribose). Le polymère peut croître jusqu'à atteindre une taille de 200 unités, avec une réaction de branchement ayant lieu toutes les 20 à 50 réactions d'élongation (Kiehlbauch *et al.*, 1993). De manière intéressante, les PARPs vont présenter des capacités différentes de polymérisation. En fonction de la taille du polymère on parlera de mono-, oligo-, poly-ADP-Ribosylation. Ainsi, on peut classer les PARPs en fonction de leur capacité de :

- Mono-ADP-ribosylation : PARP-6 à 16 et PARP-3 dont l'activité est prédite mais pas encore démontrée.
- Poly-ADP-ribosylation : PARP-1, PARP-2, PARP-5A et PARP-5B ainsi que PARP-4 dont l'activité est prédite mais pas encore démontrée.
- Oligo-ADP-ribosylation : PARP-5A et 5B.

Enfin, il est important de noter que PARP-1 et PARP-2 synthétisent la grande majorité des PAR, respectivement 85-90% et 10-15% (Leung *et al.*, 2012) ; la contribution des autres PARPs étant considérée comme négligeable comparée au total. En outre, PARP-1 et PARP-2 sont les seules capables de catalyser des réactions de polymérisation en branche. Au niveau cellulaire, la majorité de l'activité PARP est localisée au niveau du noyau bien qu'il soit également possible d'en trouver dans le cytoplasme (Bai *et al.*, 2015). En effet, certaines PARPs présentent une localisation cytoplasmique et les PAR ainsi que les protéines PARylées peuvent circuler du noyau vers le cytoplasme (Krietsch *et al.*, 2013). L'activité de PARylation cytoplasmique représenterait ainsi environ 25% de l'activité totale de la cellule (Jesser *et al.*, 1993 ; Roberts *et al.*, 1975). En ce qui concerne la présence de PARylation au niveau de la mitochondrie, le sujet fait débat (pour revues : Bai *et al.*, 2015 ; Szczesny *et al.*, 2014).

1.2.2 Réaction de dégradation de l'ADP-ribose

La PARylation possède un turnover très rapide et une durée de vie limitée de l'ordre de quelques minutes (Gagné *et al.*, 2006). Ainsi, le PAR est très rapidement dégradé en unités d'ADP-ribose par une série d'enzymes telles que la PARG (« *poly(ADP-ribose) glycohydrolase* »), ARH3 (« *ADP-ribosyl-acceptor hydrolase-3* »), ou encore les protéines contenant des macro-domaines (Feijs *et al.*, 2013 ; Mashimo *et al.*, 2014 ; Min et Wang, 2009). La dégradation rapide des PAR permet un contrôle temporel efficace sur le recrutement et la dissociation de protéines liant le PAR au niveau de localisations cellulaires spécifiques. Ce turnover rapide permet ainsi de réguler finement la réponse des PARPs.

La PARG est l'enzyme du catabolisme des PARs la plus étudiée. Dans les cellules de mammifères, elle est présente sous trois isoformes qui proviennent d'épissages alternatifs : PARG₉₉ et PARG₁₀₂ (isoformes de 99 et 102 kDa) qui sont localisés dans le cytoplasme, et PARG₁₁₀ (isoforme de 110 kDa) localisé majoritairement dans le noyau et enzymatiquement le plus actif (Meyer-Ficca *et al.*, 2004). La PARG fonctionne de façon coordonnée avec les PARPs afin de réguler un grand nombre de processus cellulaires établissant ainsi un équilibre entre synthèse et dégradation des PARs.

L'analyse cristallographique de PARG a révélé que son domaine catalytique est structurellement proche du repliement des macrodomaines, qui constituent des modules de liaison à l'ADP-ribose (*cf.*

section suivante) (Slade *et al.*, 2011 ; pour revue : Barkauskaite *et al.*, 2015). Certains résidus présents dans ce domaine, dont la glutamine 115, sont particulièrement importants pour l'interaction avec le groupement ribose du PAR (Slade *et al.*, 2011). Cette interaction permet la glycohydrolyse du pont $\alpha(1\rightarrow2)$ O-glycosidique qui relie ensemble deux monomères d'ADP-ribose consécutifs, ce qui conduit ainsi à la dégradation progressive du PAR (Ikejima et Gill, 1988 ; Gibson et Kraus, 2012 ; Slade *et al.*, 2011) (Figure 34). La PARG humaine possède à la fois une activité exo- et endoglycohydrolytique permettant ainsi la rupture des ponts $\alpha(1\rightarrow2)$ O-glycosidiques respectivement à l'extrémité et à l'intérieur du PAR (① de la figure 35) (Gibson et Kraus, 2012). Il est important de noter que l'activité de glycohydrolyse de PARG est capable de dégrader un polymère d'ADP-ribose mais pas un mono(ADP-ribose) (Lin *et al.*, 1997 ; Slade *et al.*, 2011).

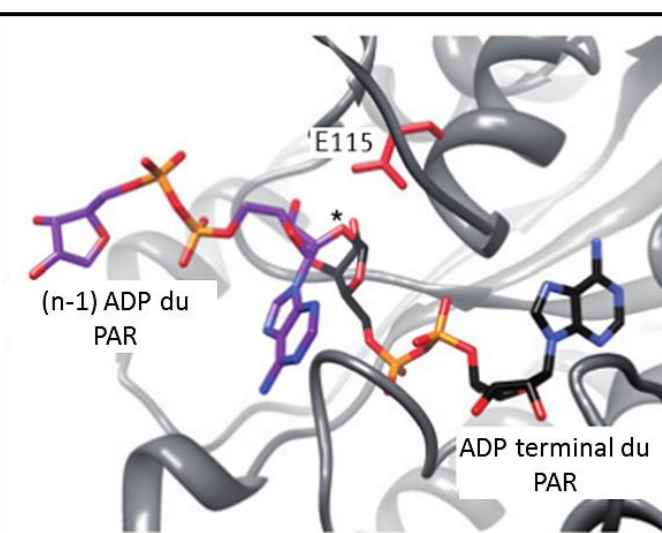


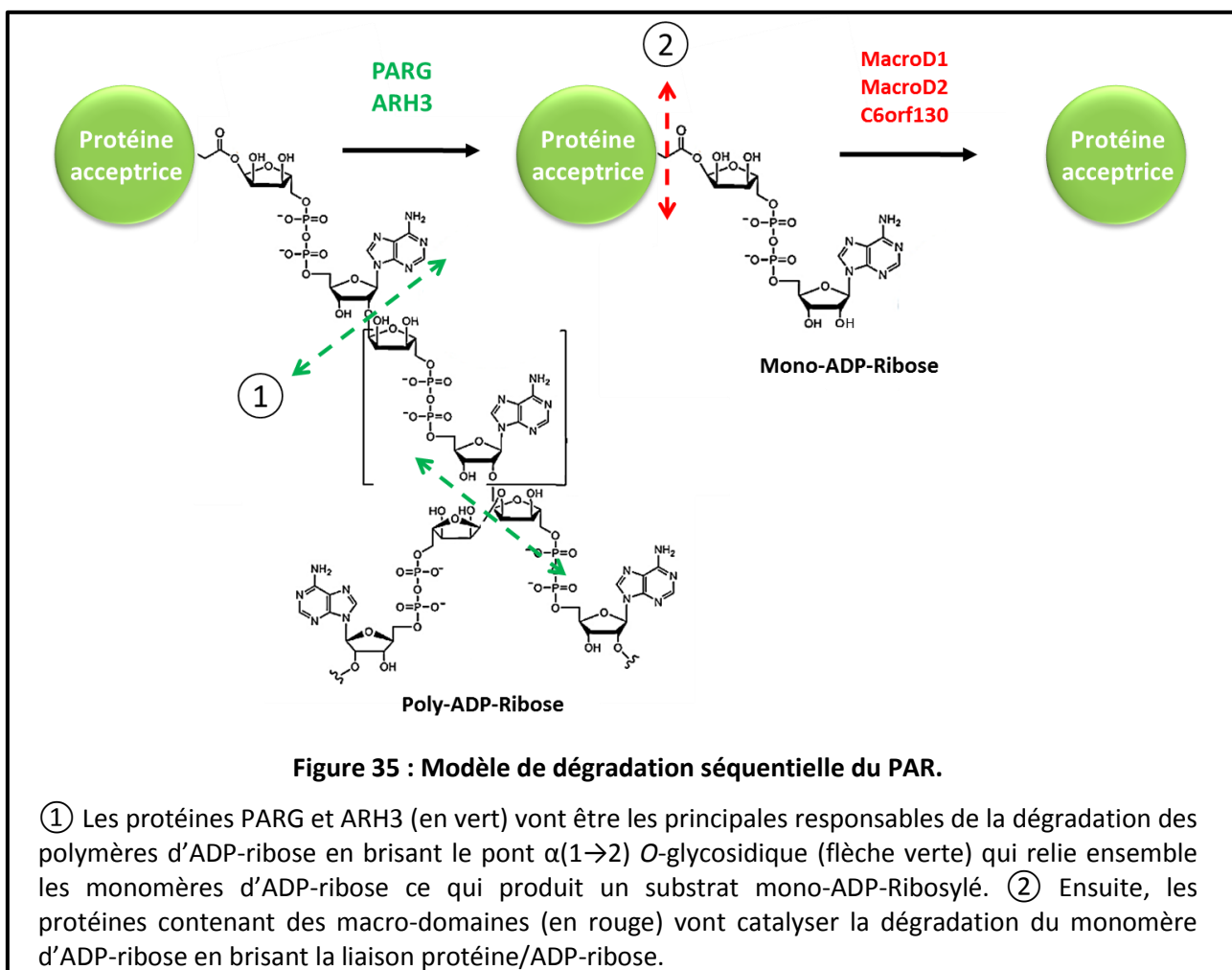
Figure 34 : Mécanisme de glycohydrolyse du poly-ADP-ribose.

Le site catalytique de PARG est indiqué, avec la Glu115 (E115) en rouge, l'ADP-ribose terminal du PAR en noir et l'ADP-ribose (n-1) du PAR en violet. L'astérisque (*) indique là où PARG va glycohydrolyser le pont $\alpha(1\rightarrow2)$ O-glycosidique (d'après Gibson et Kraus, 2012).

D'autres enzymes dégradant les PAR ont également été caractérisées. Par exemple, ARH3 est une hydrolase qui peut, tout comme PARG, catalyser la dégradation d'un polymère d'ADP-ribose mais pas d'un mono(ADP-Ribose) (① de la figure 35) (Moss *et al.*, 1992 ; Oka *et al.*, 2006). ARH3 possède une structure particulière distincte de celle de PARG qui lui permet, non seulement d'hydrolyser le PAR, mais également de retirer le groupe O-acétyle du métabolite du NAD^+ : le O-acétyle-ADP-ribose (Ono *et al.*, 2006). ARH3 est très bien conservée chez les vertébrés et semble principalement impliquée dans la dégradation de PAR associé à la matrice mitochondriale. Néanmoins, sa fonction précise reste encore peu comprise (Niere *et al.*, 2012).

Les enzymes capables de dégrader des mono-ADP-riboses sont longtemps restées inconnues. Cependant, des études récentes ont identifié des protéines contenant des macro-domaines telles que MacroD1, MacroD2 et C6orf130 qui sont capables de catalyser la dégradation d'un mono(ADP-ribose) en clivant le pont reliant la protéine au ribose (Jankevicius *et al.*, 2013 ; Rosenthal *et al.*, 2013 ; Sharifi *et al.*, 2013) (② de la figure 35).

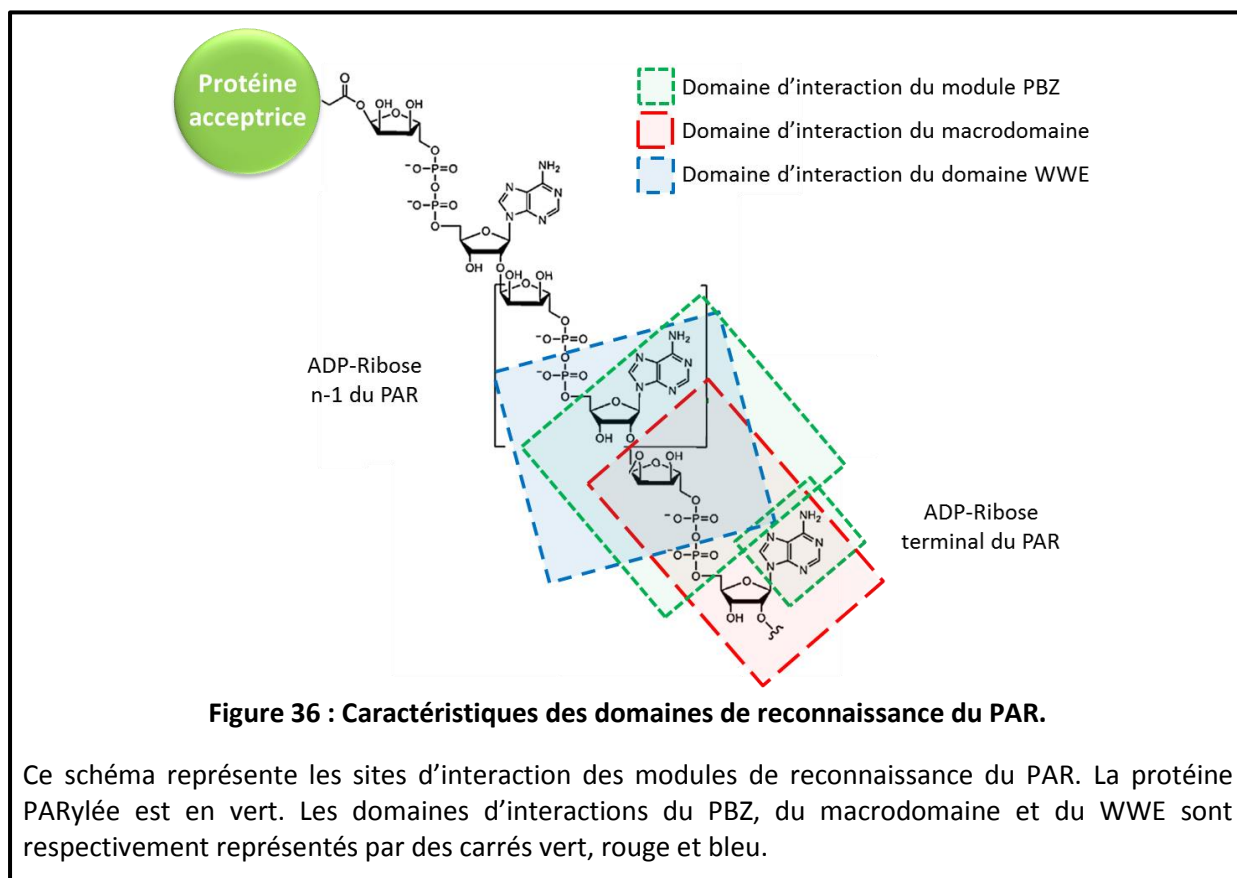
L'ensemble de ces enzymes permet ainsi de contrebalancer l'activité de PARylation des PARPs et font de la PARylation une modification post-traductionnelle très transitoire.



1.2.3 Interaction non covalente avec l'ADP-ribose

Le PAR peut être lié sur une protéine cible de manière covalente modulant ainsi la fonction et la localisation de cette dernière, ces effets étant dépendants de chaque cible. Il peut également favoriser des interactions protéines-protéines. Ce dernier aspect permet le recrutement local, en réponse à un stress donné, de nombreuses protéines. Des modules participant à la reconnaissance et à l'interaction avec le PAR ont ainsi été identifiés dans la séquence de certaines protéines. Quatre

types de modules ont été caractérisés : ❶ le PBM (« *PAR-binding motif* »), ❷ le PBZ (« *PAR-binding zinc finger* »), ❸ le « *macrodomain fold* » et ❹ le domaine WWE. Chacun de ces modules présente un mode d'interaction différent avec le PAR (Figure 36) (Gibson et Kraus, 2012). Certains sont parties intégrantes des PARPs permettant ainsi leur auto-PARYlation, et la plupart ont été identifiés lors de la réponse aux dommages de l'ADN (pour revue : Daniels *et al.*, 2015).



❶ Le domaine PBM fût le premier module identifié (Pleschke *et al.*, 2000) : il est constitué d'une courte séquence d'acides aminés composée de plusieurs clusters de lysine-arginine entrecoupés par des acides aminés plus hydrophobes (Pleschke *et al.*, 2000). La séquence consensus de ce domaine est $[HKR]_1-X_2-X_3-[AIQVY]_4-[KR]_5-[KR]_6-[AILV]_7-[FILPV]_8$. Les variations observées dans la séquence du domaine PBM pourraient permettre l'interaction avec différentes protéines tout en conservant une spécificité de reconnaissance du PAR (Huambachano *et al.*, 2011). Il semble que les acides aminés hydrophobes de ce domaine coopèrent avec les résidus basiques dans la reconnaissance du PAR. Néanmoins, il existe peu d'informations structurales sur l'interaction PAR-PBM. Le PBM est retrouvé dans un large spectre de protéines, ce qui inclue des protéines de réponses aux dommages de l'ADN, des enzymes responsables du remodelage de la chromatine ou

des protéines impliquées dans la transcription des ARNs (Gagné *et al.*, 2008, pour revue : Hassa et Hottiger, 2008 ; Schreiber *et al.*, 2006).

② Le PBZ est un autre module de liaison au PAR relativement petit et non structuré de l'ordre de 3,5 kDa. La spécificité de ce module se fait par un repliement coordonné par le zinc qui promeut l'interaction avec un ou deux groupements adénines d'une unité d'ADP-ribose ou avec un pont $\alpha(1\rightarrow2)$ O-glycosidique présent entre deux ADP-riboses (en vert, figure 36) (Ahel *et al.*, 2008 ; Eustermann *et al.*, 2010 ; Oberoi *et al.*, 2010). Le domaine PBZ possède une affinité forte pour le PAR, de l'ordre du nanomolaire, voire du sub-nanomolaire lorsqu'il fonctionne en tandem. Cette forte affinité permet à ce module d'initier une réponse rapide et locale, notamment lors de dommages de l'ADN, en favorisant le recrutement de protéines clés.

③ Le troisième module identifié est le « *macrodomain fold* » d'une taille d'environ 20 kDa. Il s'agit d'un domaine de liaison au PAR créant une interaction au niveau de l'ADP-ribose terminal (en rouge, figure 36) et retrouvé dans différentes protéines incluant le variant d'histone macroH2A, des membres des MacroPARPs ou encore MacroD1 (pour revue : Han *et al.*, 2011). Le macrodomaine possède des similarités fonctionnelles avec le domaine PBZ. Ainsi, il reconnaît le PAR via son interaction avec l'ADP-ribose avec une affinité de l'ordre du micromolaire, voire du sub-micromolaire lorsqu'il fonctionne en tandem (Karras *et al.*, 2005 ; Kustatscher *et al.*, 2005). Il permet, comme le domaine PBZ, de recruter rapidement des protéines aux sites de PARylation (Ahel *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2010 ; Mehrotra *et al.*, 2011 ; Gottschalk *et al.*, 2009).

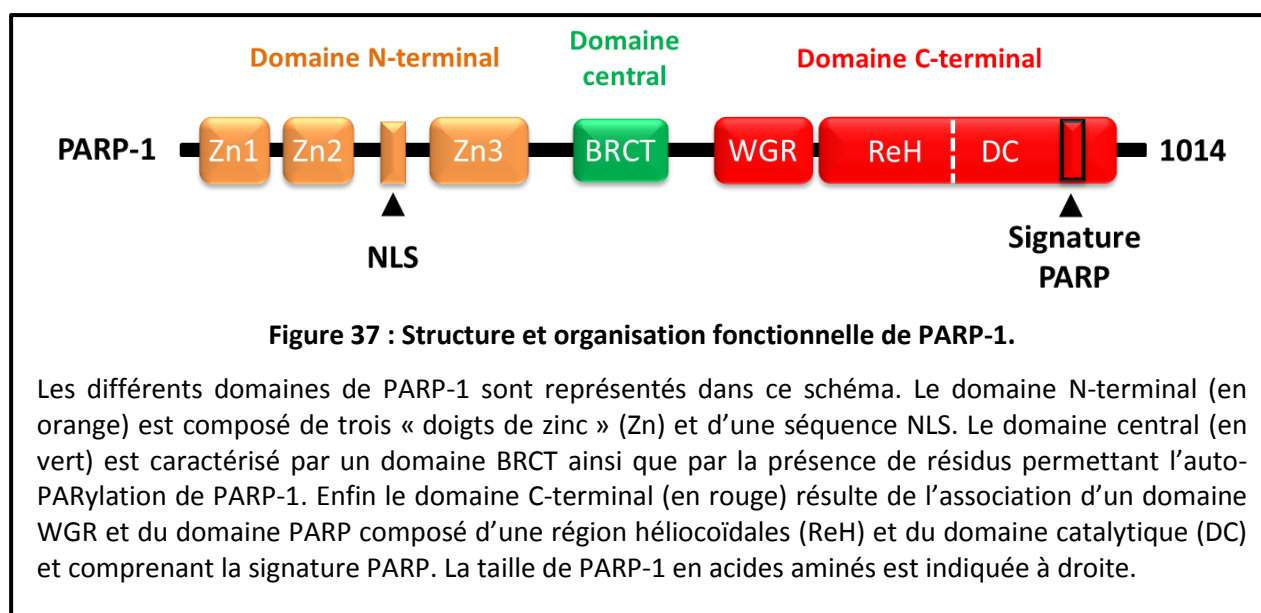
④ Enfin, le domaine WWE est un module d'environ 10 kDa découvert récemment (Aravind, 2001 ; Wang *et al.*, 2012 ; Zhang *et al.*, 2011) et qui reconnaît spécifiquement le pont $\alpha(1\rightarrow2)$ O-glycosidique caractéristique du PAR (en bleu, figure 36) (Wang *et al.*, 2012). Il possède des interactions fonctionnelles avec les mécanismes d'ubiquitination, notamment car il est présent dans la séquence de certaines ubiquitines ligases.

Les PARPs initient donc la première étape d'un métabolisme complexe dépendant de la synthèse et de la dégradation du PAR. Ce dernier constitue une modification post-traductionnelle rapide et transitoire en réponse à différents stress et permet de moduler l'activité ou le recrutement de protéines impliquées dans une grande variété de mécanismes cellulaires (pour revue : Gibson et Kraus, 2012). Parmi les PARPs, PARP-1 demeure la protéine la plus étudiée notamment car elle synthétise la grande majorité des polymères. Ses fonctions ainsi que ses modes de régulation seront plus particulièrement détaillés dans la suite de ce manuscrit.

2. La protéine PARP-1 : généralités

2.1 Domaines de PARP-1

PARP-1 est une enzyme hautement conservée d'un poids moléculaire d'environ 113 kDa (D'amours *et al.*, 1999). La structure de PARP-1 peut être définie selon trois sections : le domaine N-terminal comprenant le site de liaison à l'ADN, le domaine central comprenant les sites d'auto-modifications de PARP-1, et enfin le domaine C-terminal responsable de l'activité catalytique de PARP-1 (pour revue : Krishnakumar et Kraus, 2010) (Figure 37).



2.1.1 Le domaine N-terminal

Le domaine N-terminal (en orange, figure 37) est principalement constitué de trois « doigts de zinc » Cys-Cys-His-Cys (Zn1, Zn2 et Zn3) permettant la liaison de PARP-1 sur l'ADN. Les deux premiers (Zn1 et Zn2) vont permettre le recrutement de PARP-1 au niveau d'une cassure d'ADN induisant ainsi son activation. Le troisième « doigt de zinc » (Zn3) a été identifié récemment (Langelier *et al.*, 2008) et pourrait remplir deux rôles. Il pourrait permettre un contact inter-domaines important pour l'assemblage de PARP-1 active au niveau de l'ADN. En outre, il pourrait également participer au remodelage de la chromatine dépendant de PARP-1 (Langelier *et al.*, 2010). Enfin, le domaine N-terminal contient une séquence de localisation nucléaire (NLS) (Schreiber *et al.*, 1992).

2.1.2 Le domaine central

Le domaine central (en vert, figure 37) contient le domaine BRCT (« *BRCA1 C-terminus* ») de PARP-1 nécessaire à de nombreuses interactions protéines-protéines, permettant notamment la liaison de PARP-1 avec des enzymes de la voie de réparation de l'ADN (Loeffler *et al.*, 2011 ; El

Khamisy *et al.*, 2003). Ce domaine contient également plusieurs résidus glutamine, aspartate et lysine proposés comme étant des accepteurs potentiels pour l'auto-PARylation de PARP-1 (Luo et Kraus, 2012). Enfin, ce domaine comprend un motif « glissière à leucine » qui va favoriser l'homo- ou l'hétéro-dimérisation de PARP-1 avec elle-même ou d'autres membres de la famille des PARPs, stimulant ainsi sa PARylation.

2.1.3 Le domaine C-terminal

Quant au domaine C-terminal de PARP-1 (en rouge, figure 37), il renferme le domaine PARP caractéristique de la famille, comprenant une région hélicoïdale (ReH) ainsi que le domaine catalytique (DC) contenant lui-même une région appelée signature PARP, hautement conservée et responsable de la fixation du NAD^+ (Ame *et al.*, 2004 ; Ruf *et al.*, 1996 ; Ruf *et al.*, 1998). Le domaine C-terminal inclut également un motif WGR qui semble jouer un rôle important lors de l'interaction de PARP-1 avec l'ADN (Altmeyer *et al.*, 2009 ; Krishnakumar et Kraus, 2010 ; Langelier *et al.*, 2012).

2.2 Activité enzymatique de PARP-1

PARP-1 est caractérisée biochimiquement par sa capacité de synthèse et de transfert d'ADP-ribose médiée par son domaine C-terminal. Elle va catalyser le clivage du NAD^+ générant ainsi deux produits : une molécule de nicotinamide (NAM) et une molécule d'ADP-ribose par molécule de NAD^+ métabolisée (*cf. section 1.2.1*). La cible principale de PARylation de PARP-1 est elle-même (Luo et Kraus, 2012). L'auto-PARylation de PARP-1 semble se faire principalement au niveau du domaine central de PARP-1 bien qu'une étude récente ait identifié des sites potentiels tout le long de la protéine (Gagné *et al.*, 2015). En accord avec ses fonctions, PARP-1 va également PARyler une grande variété de protéines impliquées dans le métabolisme de l'ADN (Figure 38) (Jungmichel *et al.*, 2013).

En tant que membre de la sous-famille des PARPs-dépendantes de l'ADN, PARP-1 présente une activité dramatiquement augmentée après liaison à une cassure de l'ADN (D'Amours, 1999). L'étude cristallographique du complexe PARP-1/ADN (Figure 39, panel du haut) (Langelier *et al.*, 2012 ; pour revue : Langelier et Pascal, 2013) a permis de caractériser sa liaison avec l'ADN d'un point de vue structural et a identifié des changements conformationnels de PARP-1 au cours de cette interaction.

Les « doigts de zinc » Zn1 et Zn2 ainsi que le domaine WGR participent ensemble à la liaison au niveau d'une cassure de l'ADN. PARP-1 va d'abord interagir via l'enchaînement de ribose-phosphate de l'ADN, en établissant des contacts hydrophobes avec les bases nucléotidiques exposées de l'ADN endommagé. Ensuite, des interactions dépendantes des domaines de PARP-1 vont s'établir. Ainsi,

Zn1 va se lier à l'ADN grâce à deux régions conservées nommées « *backbone grip* » et « *base-stacking loop* », tandis que Zn3 va se lier à l'ADN à côté du domaine Zn1, ce qui conduit à l'enjambement du petit sillon de l'ADN. Enfin, le domaine WGR va se lier à une extrémité 5' du brin d'ADN, enfermant l'ADN entre son feuillet β central et son hélice α (Figure 39, panel du bas) (Langelier *et al.*, 2012).

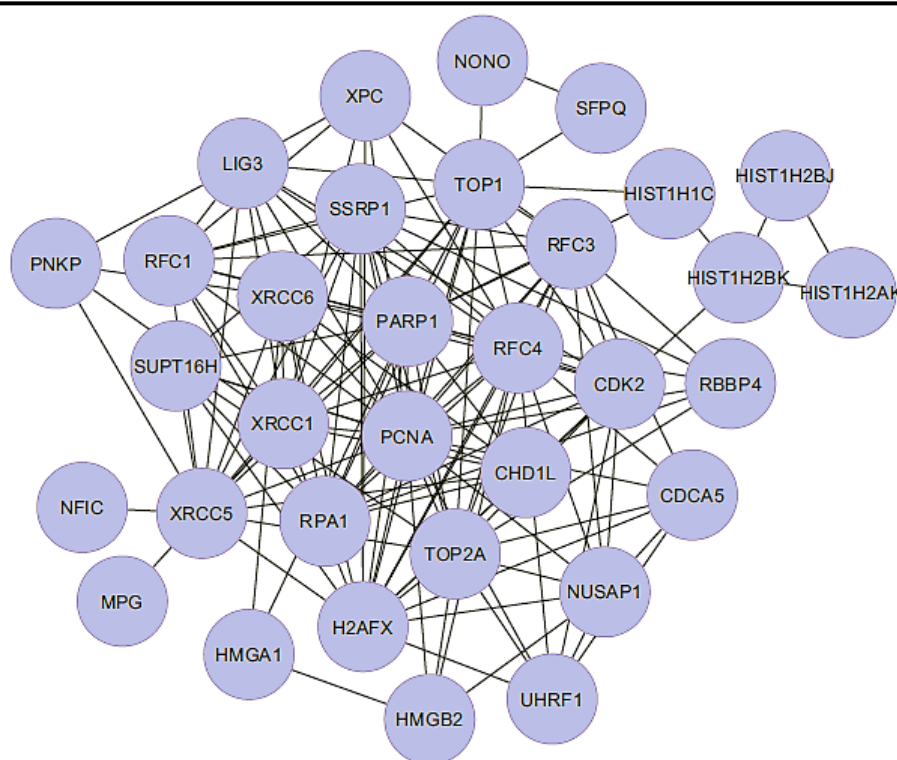


Figure 38 : Protéines impliquées dans le métabolisme de l'ADN et PARylées par PARP-1.

Réseau d'interaction de protéines significativement PARylées par PARP-1, identifiées par des expériences de SILAC (d'après Jungmichel *et al.*, 2013)

Au sein de ce complexe, les domaines de PARP-1 vont, en plus de se lier à l'ADN, interagir aussi entre eux. Les domaines Zn1 et Zn3, en interaction avec l'ADN, offrent une surface de contact à deux points avec l'orientation et l'espacement appropriés pour interagir avec le domaine WGR. Ce dernier va interagir avec la région hélicoïdale du domaine PARP constituant ainsi des interfaces entre Zn1/WGR/ReH et Zn3/WGR/ReH (① de la figure 39). Ces deux interfaces permettent de créer un pont entre l'ADN et le domaine catalytique de PARP-1. Enfin, Zn3 crée une troisième interface en interagissant avec Zn1 à l'aide de sa région N-terminale (② de la figure 39). La formation de ces trois interfaces est primordiale pour l'activité de PARP-1. En effet la mutation de certains résidus clés impliqués dans la formation de ces interfaces conduit à une altération de l'auto-modification de PARP-1 (Langelier *et al.*, 2012).

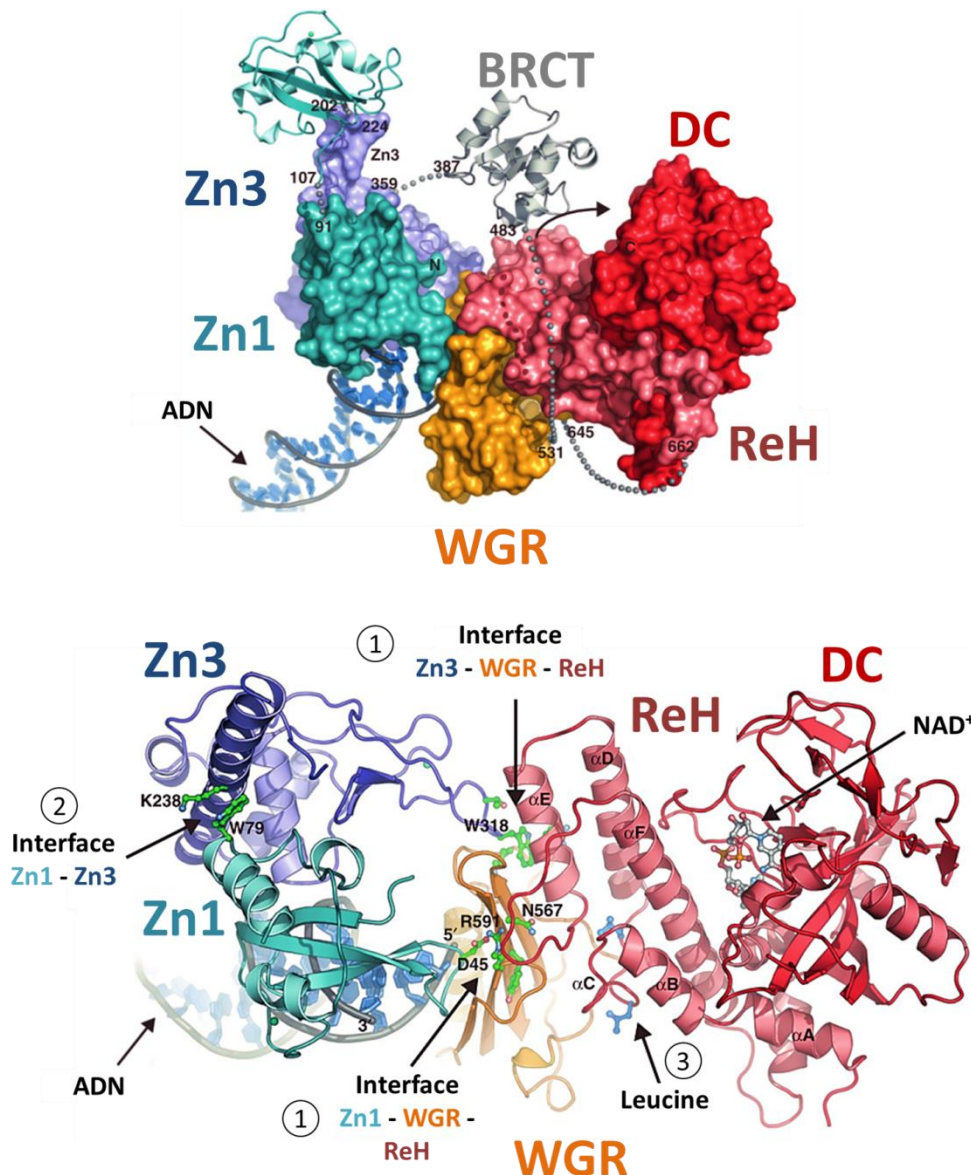


Figure 39 : Modélisations du complexe PARP-1/ADN.

Panel du haut : structure cristallographique de PARP-1 en complexe avec l'ADN. Panel du bas : modélisation des positions relatives des domaines de PARP-1 liés à l'ADN. En bleu, les deux domaines à « doigts de zinc », Zn1 en bleu clair et Zn3 en bleu foncé. En orange le domaine WGR. En rouge clair le domaine catalytique (DC) et en rouge foncé la région hélicoïdale (ReH). Le domaine BRCT est en gris. Une molécule de NAD^+ est représenté au niveau du site actif et l'ADN en interaction avec les « doigts de zinc » est figuré en bas à gauche. ① Premières interfaces inter-domaines de PARP-1 entre les régions Zn3/Zn1 – WGR – RH. ② Deuxième interface inter-domaine entre les « doigts de zinc » Zn1 et Zn3. ③ Enfin, le résidu Leucine impliqué dans la distorsion de PARP-1 qui est associée à son activation après interaction avec l'ADN est indiqué (adapté de Langelier et Pascal, 2013).

L'étude cristallographique de PARP-1 liée à l'ADN a également révélé que la mise en place de ces interfaces inter-domaines conduit à la distorsion de la région hélicoïdale du domaine PARP permettant ainsi une modification conformationnelle de PARP-1 après interaction avec l'ADN. La

mise en place des interfaces entre les doigts de zinc et la région hélicoïdale est effectivement à l'origine du déplacement d'un résidu leucine conservé (③ de la figure 39), ce qui entraîne une modification de conformation du domaine catalytique. Ce changement de conformation joue un rôle dans l'activation de PARP-1 dépendante de l'ADN. En effet, la mutation de certains résidus permettant de mimer cette distorsion, induit une augmentation de l'activité de PARP-1 indépendamment de sa liaison à l'ADN (Langelier *et al.*, 2012). En outre, en accord avec ces observations, de la mutagenèse aléatoire au niveau de la région hélicoïdale a permis d'identifier un mutant de PARP-1 (L713F) constitutivement actif en absence d'ADN (Miranda *et al.*, 1995).

2.3 Régulation de l'activité de PARP-1

Comme beaucoup d'enzymes régulant de nombreux aspects du métabolisme cellulaire, PARP-1 est elle-même régulée en amont par des effecteurs qui vont contrôler son activité et certaines de ses fonctions (pour revues : Krishnakumar et Kraus, 2010 ; Luo et Kraus, 2012). PARP-1 est ainsi principalement régulée par différents types de modifications post-traductionnelles mais également par le métabolisme du NAD⁺.

2.3.1 Régulation de PARP-1 via des modifications post-traductionnelles

PARP-1 est sujette à une grande variété de modifications post-traductionnelles telles que sa PARYlation, sa phosphorylation, son acétylation, sa SUMOylation et enfin son ubiquitination (Figure 40) (pour revues : Krishnakumar et Kraus, 2010 ; Luo et Kraus, 2012).

PARP-1 est PARYlée par elle-même, mais également par PARP-2 et probablement par d'autres membres de la famille des PARPs. L'auto-modification de PARP-1 en réponse à des dommages de l'ADN, représente la première modification post-traductionnelle observée pour PARP-1 (D'amours *et al.*, 1999). Elle peut consister en l'addition d'une chaîne d'ADP-ribose composée de > 200 unités ou bien en l'addition d'une chaîne plus modeste constituée d'une seule unité ou bien de quelques unités (≈20) (D'amours *et al.*, 1999 ; Mendoza-Alvarez et Alvarez-Gonzalez, 1999). Des études de mutagenèse dirigée ont permis d'identifier les lysines 498, 521 et 524 comme sites potentiels pour cette auto-modification (Altmeyer *et al.*, 2009). Néanmoins, ces résultats doivent être interprétés avec précaution. En effet, la mutation de résidus spécifiques de PARP-1 pourrait réduire l'auto-modification de PARP-1 sans pour autant correspondre aux sites de liaison du PAR (Krishnakumar et Kraus, 2010). En outre, une étude récente a identifié de nombreux autres sites potentiels de PARYlation, complexifiant encore la caractérisation des sites de PARYlation de PARP-1 (Gagné *et al.*, 2015).

L'auto-PARylation extensive de PARP-1 ($n > 200$ unités) entraîne l'inhibition de son activité catalytique et son relargage de la chromatine, probablement à cause d'une répulsion entre les charges du PAR et de l'ADN, ou à cause d'un encombrement stérique des PARs qui vont masquer le domaine de liaison à l'ADN (D'Amours *et al.*, 1999 ; Kim *et al.*, 2004 ; Petesch et Lis, 2008 ; Tulin et Spradling, 2003 ; Wacker *et al.*, 2007). Les effets d'une auto-PARylation plus modérée ne sont pas clairs, l'ajout d'un nombre restreint de PARs étant à l'origine d'une altération de l'activité de PARP-1 sans pour autant induire son relargage de la chromatine (Krishnakumar et Kraus, 2010).

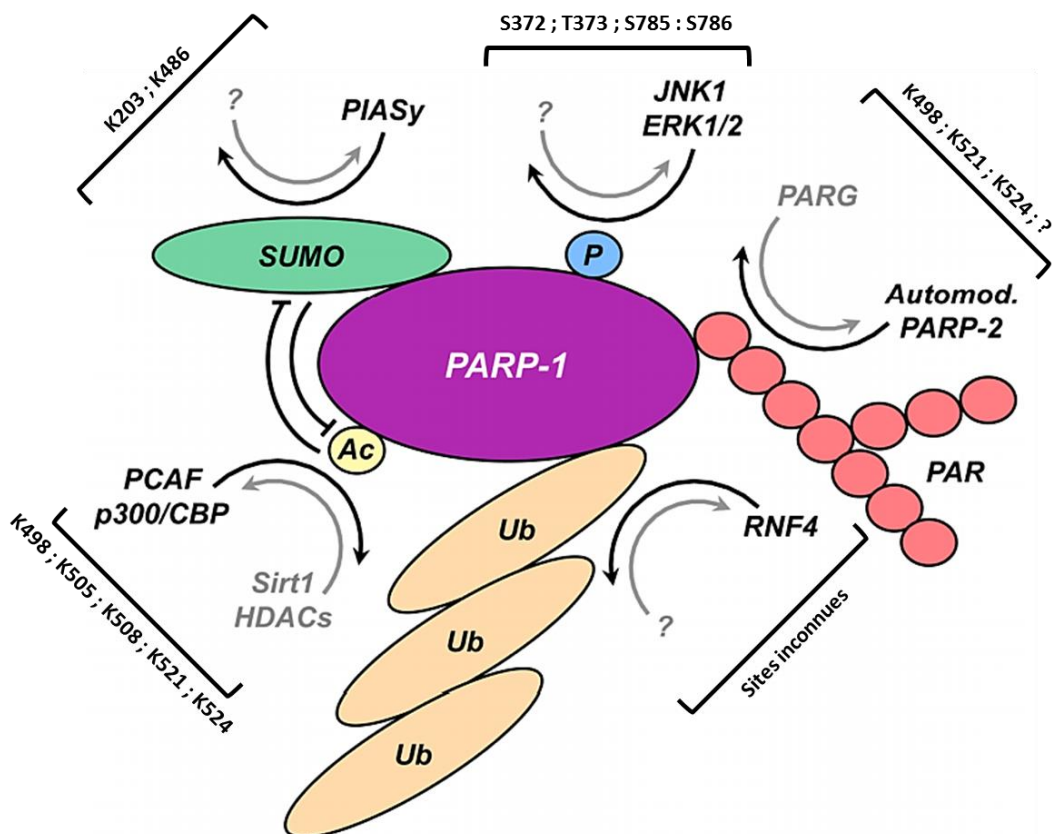


Figure 40 : Modifications post-traductionnelles covalentes de PARP-1.

La SUMOylation (en vert) de PARP-1 est catalysée par la protéine PIASy et sa phosphorylation (en bleu) est dépendante des protéines ERK1/2 (« *extracellular signal-regulated kinase 1/2* ») sur la sérine 372 et la thréonine 373, et par JNK1 (« *c-jun N-terminal kinase 1* ») sur des sites encore inconnus. La PARylation (en rouge) de PARP-1 peut se faire soit par auto-modification ou bien être catalysée par PARP-2. L'ubiquitination (en beige) de PARP-1 est catalysée par la protéine RNF4. L'acétylation (en jaune pâle) de PARP-1 est dépendante des protéines PCAF et p300/CBP tandis que les réactions de déacétylation de PARP-1 sont catalysées par des HDACs telles que Sirt1. Les positions des sites de modifications sont indiquées à côté de chaque type de modification (adapté de Krishnakumar et Kraus, 2010).

La phosphorylation constitue également une voie de régulation de la protéine PARP-1. PARP-1 est ainsi phosphorylée par ERK1/2 (« *extracellular signal-regulated kinase 1/2* ») sur la sérine 372 et la thréonine 373, et par JNK1 (« *c-jun N-terminal kinase 1* ») sur des sites encore inconnus.

(Kauppinen *et al.*, 2006 ; Zhang *et al.*, 2007). La phosphorylation par ERK1/2 est requise pour l'activation maximale de PARP-1 après des dommages de l'ADN (Kauppinen *et al.*, 2006) alors que la phosphorylation par JNK1 promeut l'activation de PARP-1 lors de la mort cellulaire non apoptotique induite par H₂O₂ (Zhang *et al.*, 2007). Plus récemment, d'autres sites ont été identifiés sur la base d'une étude protéomique (Gagné *et al.*, 2009) mais n'ont pas encore été caractérisés d'un point de vue fonctionnel.

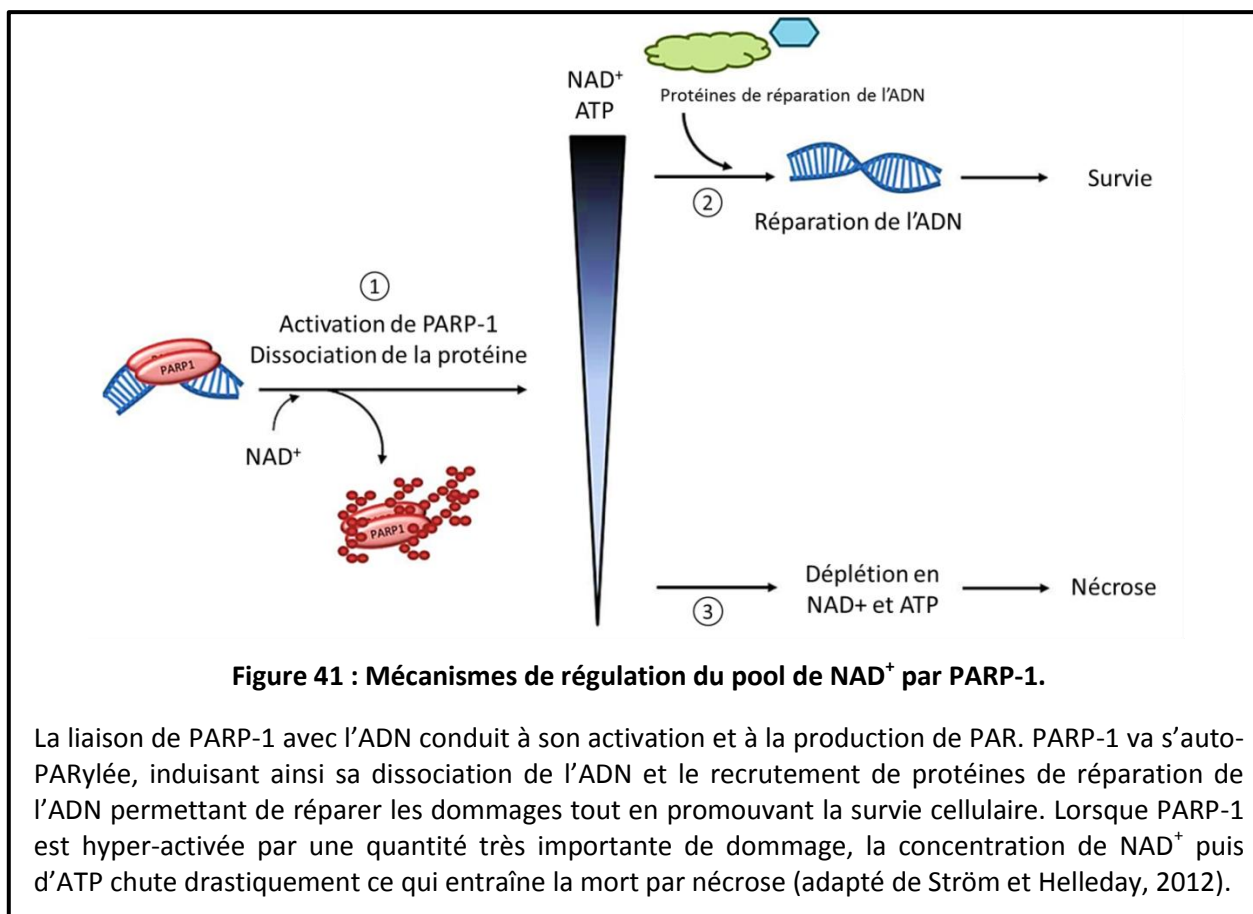
PARP-1 est également acétylée par l'acétyl-transférase p300/CBP et par PCAF, alors que sa dé-acétylation est assurée par différentes HDACs (« *histone acétyl déacétylase* ») dont Sirt1 (Hassa *et al.*, 2003 ; Hassa *et al.*, 2005 ; Rajamohan *et al.*, 2009). Au niveau fonctionnel, l'acétylation de PARP-1 joue un rôle critique dans la régulation des gènes cibles de NF-κB au cours de la réponse inflammatoire, et participe dans les cardiomyocytes, à l'activation de PARP-1 lors d'un stress (Hassa *et al.*, 2003 ; Hassa *et al.*, 2005 ; Rajamohan *et al.*, 2009).

Enfin, la SUMOylation et l'ubiquitination de PARP-1 ont toutes deux été décrites récemment et modulent le rôle de PARP-1 dans la régulation de la structure de la chromatine et dans la transcription (Martin *et al.*, 2009 ; Messner *et al.*, 2009). Il est intéressant de noter que la SUMOylation et l'acétylation de PARP-1 sur la Lys 486 sont mutuellement exclusives (Messner *et al.*, 2009). Ainsi, la SUMOylation de PARP-1 pourrait moduler les mécanismes régulés par son acétylation, notamment la stimulation de la transcription au niveau de certains promoteurs (Hassa *et al.*, 2003 ; Hassa *et al.*, 2005 ; Messner *et al.*, 2009). En outre, au cours de la mitose, la SUMOylation de PARP-1 présente aux centromères, régule son activité et son interaction avec certains partenaires tels que PICH (Sridharan *et al.*, 2015). Enfin, l'ubiquitination de PARP-1, a probablement lieu au niveau du site de liaison à l'ADN et va promouvoir sa dégradation, régulant ainsi l'ensemble de ses fonctions (Wang *et al.*, 2008). Par exemple, l'auto-PARYlation de PARP-1 en réponse à des inhibiteurs des microtubules, stimule son interaction avec l'E3-ubiquitine ligase CHFR qui va l'ubiquitiner, conduisant ainsi à sa dégradation et à l'arrêt du cycle en prophase (Kashima *et al.*, 2012).

2.3.2 Enzyme du métabolisme du NAD⁺

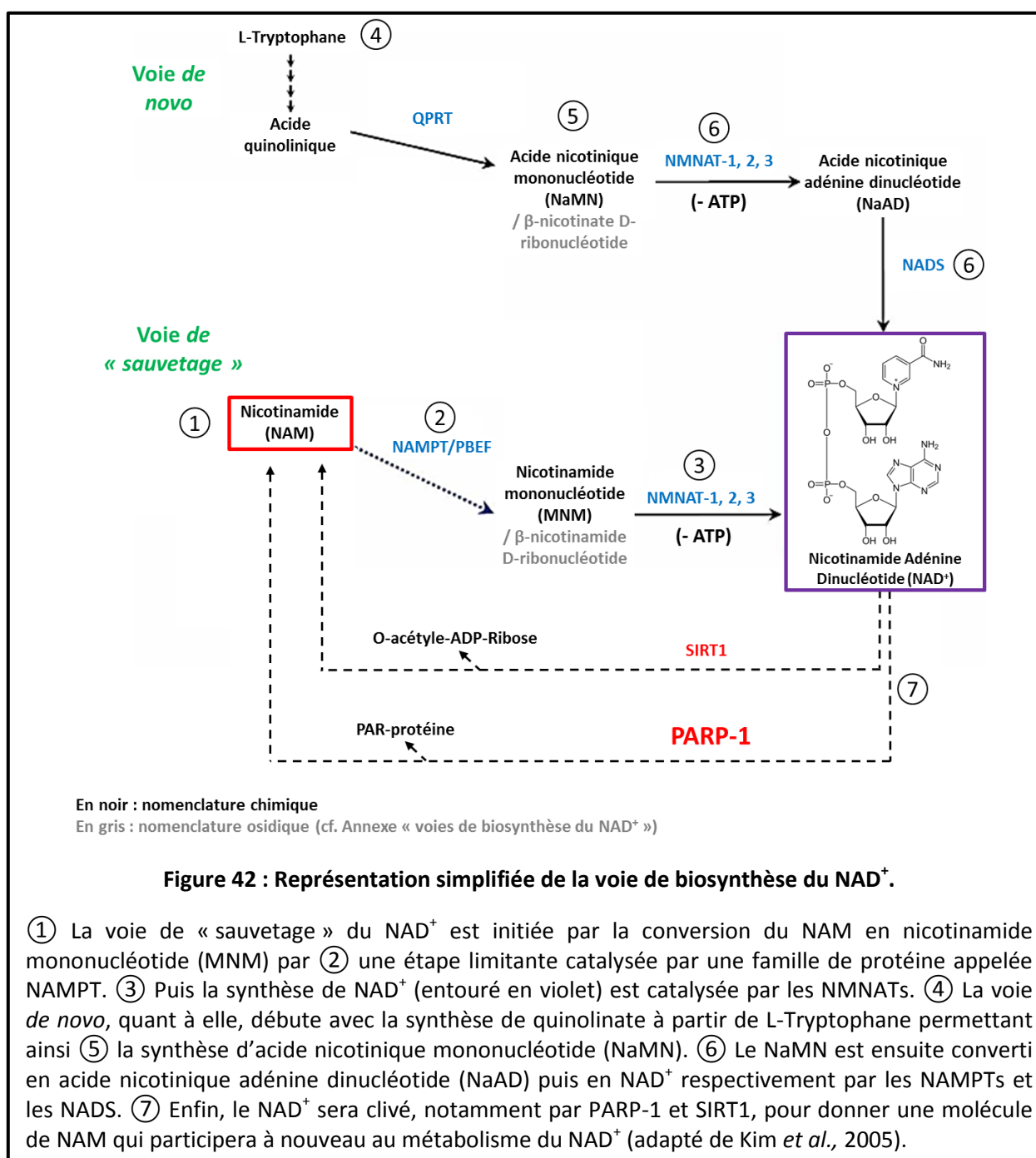
L'activité enzymatique de PARP-1 requiert un approvisionnement en NAD⁺ pour synthétiser les unités d'ADP-ribose utilisées pour former le PAR (① de la figure 41) ; cette étape étant nécessaire pour initier la réparation de l'ADN et promouvoir la survie cellulaire (② de la figure 41). Contrairement aux réactions rédox cellulaires qui utilisent le NAD⁺ comme cofacteur, n'induisant donc pas de chute de sa concentration, PARP-1 va catalyser le clivage du pont glycosidique entre le nicotinamide et le groupement ADP-ribose du NAD⁺, conduisant ainsi à une déplétion en NAD⁺. Par

conséquent, l'hyper-activation de PARP-1 lorsque l'ADN est très endommagé entraîne une chute drastique de la concentration de NAD^+ puis d'ATP (nécessaire à sa resynthèse) ce qui provoque la mort cellulaire par nécrose (③ de la figure 41). Ce mécanisme permet ainsi l'élimination des cellules ayant subi des dommages trop importants (Decker et Muller, 2002 ; Bouchard *et al.*, 2003). En conséquence, la resynthèse du NAD^+ est essentielle pour maintenir l'activité de PARP-1 et donc promouvoir ses fonctions. Ainsi, la disponibilité (et probablement la localisation) du NAD^+ représente un élément de contrôle clé de l'activité de PARP-1 (pour revue Kim *et al.*, 2005).



La biosynthèse du NAD^+ (pour revue : Dölle *et al.*, 2013 ; pour les voies de synthèse détaillées du NAD^+ se référer à l'annexe « voies de biosynthèse du NAD^+ », p.287) peut se faire selon deux voies : la voie *de novo* et la voie de « sauvetage » (en vert, figure 42) (Rongvaux *et al.*, 2003). La voie de « sauvetage » commence par la transformation du nicotinamide (NAM) (① de la figure 42, entouré en rouge) qui est probablement le précurseur le plus pertinent du NAD^+ dans la régulation de l'activité de PARP-1 chez les mammifères (Rongvaux *et al.*, 2003). Au cours de cette voie, il est d'abord converti en nicotinamide mononucléotide (NMN) par une étape limitante catalysée par une famille de protéines appelées NAMPT (« nicotinamide phosphoribosyltransferase ») (② de la figure 42). Puis la synthèse de NAD^+ (entouré en violet, figure 42) est catalysée par les NMNATs (« NMN

adenyltransferase ») (③ de la figure 42) (Magni *et al.*, 2004). La voie *de novo*, quant à elle, débute avec la synthèse de quinolinatate à partir de L-Tryptophane (④ de la figure 42) permettant ensuite la synthèse d'acide nicotinique mononucléotide (NaMN) (⑤ de la figure 42). Le NaMN est alors converti en acide nicotinique adénine dinucléotide (NaAD) puis en NAD^+ respectivement par les NAMPTs et les NADS (« *NAD synthase* ») (⑥ de la figure 42). Enfin, le NAD^+ sera clivé, notamment par PARP-1 et Sirt-1, pour donner une molécule de NAM qui participera à nouveau au métabolisme du NAD^+ (⑦ de la figure 42). Il est intéressant de noter que les NAMPTs sont impliquées à la fois dans la voie *de novo* et la voie de « sauvetage » car elles ont pour substrats le MNM et le NaMN.



Il est important de noter que même si le pool de NAD^+ peut se déplacer librement entre le noyau et le cytoplasme, NMNAT-1 est une protéine nucléaire (Schweiger *et al.*, 2001) alors que NMNAT-2 et 3 sont cytoplasmiques (Berger *et al.*, 2004). Cette observation suggère que la production locale de NAD^+ pourrait être importante pour les mécanismes qui lui sont dépendants (Mack *et al.*, 2001 ; Araki *et al.*, 2004). En accord avec cette observation, NMNAT-1 interagit avec PARP-1, permettant ainsi son recrutement au niveau de certains promoteurs (Berger *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 2012). Ce recrutement permet la synthèse locale de NAD^+ , constituant un pool de NAD^+ utilisé pour l'activité de PARP-1. Étonnamment, NMNAT-1 induit également une augmentation de l'activité de PARP-1 indépendamment du NAD^+ , laissant penser que ce type d'enzyme pourrait réguler PARP-1 par l'intermédiaire d'un mécanisme plus complexe que la seule production de NAD^+ (Zhang *et al.*, 2012). Des résultats similaires ont également été obtenus pour la protéine Sirt1, une autre enzyme dont l'activité est dépendante du NAD^+ , et qui va recruter NMNAT-1 au niveau de certains promoteurs (Zhang *et al.*, 2009).

Enfin, la létalité synthétique observée entre PARP-1 et NAMPT constitue un autre exemple intéressant des liens existants entre la synthèse de NAD^+ et l'activité de PARP-1 (Bajrami *et al.*, 2012). En effet, l'inhibition chimique de NAMPT (responsable de la synthèse de NMN, ② de la figure 42) conduit à une diminution drastique de la concentration en NAD^+ améliorant ainsi l'efficacité de l'olaparib, un inhibiteur de PARP-1. Étant donné que l'olaparib est un inhibiteur catalytique réversible de PARP-1 (pour revue : Marchetti *et al.*, 2012), il a été proposé que la diminution du NAD^+ subséquente de l'inhibition de NAMPT, pourrait abaisser la compétition pour la fixation sur PARP-1 existante entre l'olaparib et le NAD^+ , amplifiant ainsi l'efficacité de cet inhibiteur (Bajrami *et al.*, 2012).

Ces exemples illustrent l'importance des voies de synthèse du NAD^+ dans la régulation de l'activité de PARP-1. Des inhibiteurs de certaines enzymes de ce métabolisme existent déjà et pourraient donc fournir une approche alternative intéressante dans l'inhibition de PARP-1 (pour revues : Sampath *et al.*, 2015 ; Dölle *et al.*, 2013) ; en gardant toutefois à l'esprit que PARP-1 n'est pas la seule enzyme dépendante du NAD^+ .

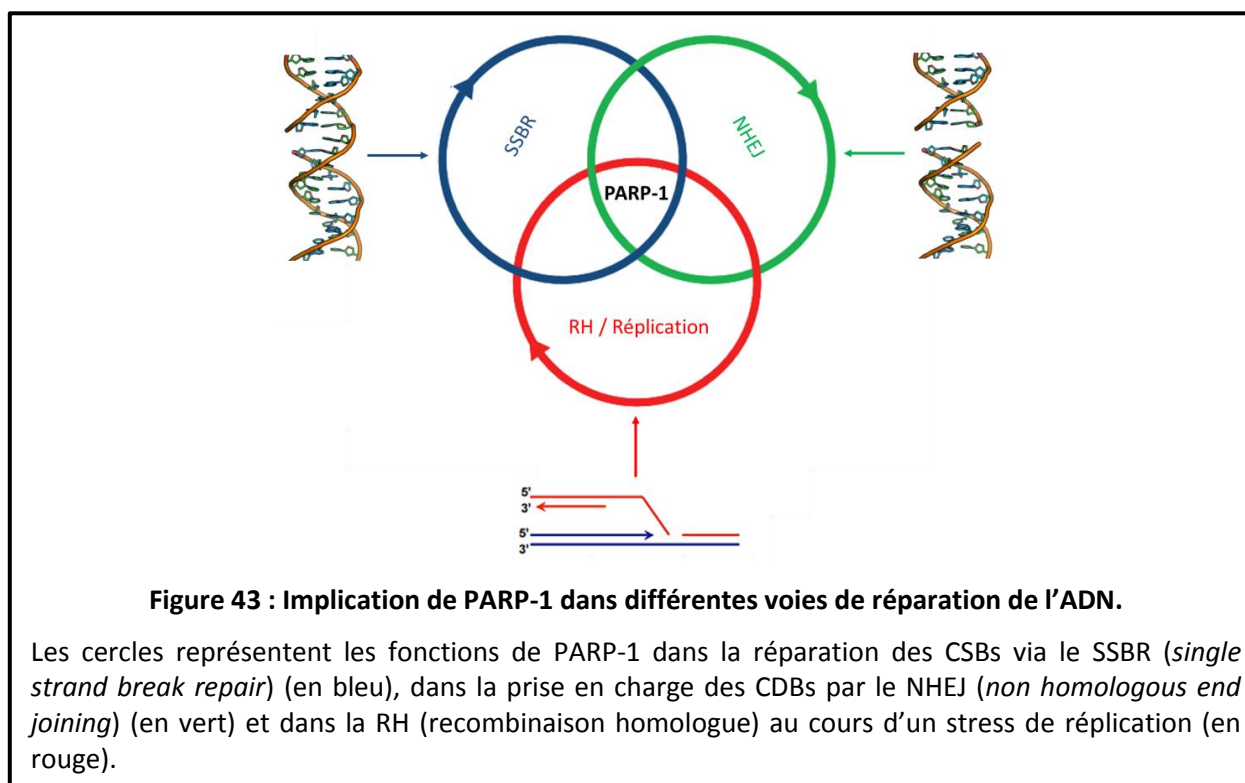
*En raison du nombre impressionnant de mécanismes cellulaires impliquant PARP-1, seuls ceux présentant un lien avec mon sujet seront présentés dans ce manuscrit. Les sections suivantes seront donc dédiées aux fonctions de PARP-1 dans la réparation de l'ADN et dans les processus de cancérogénèse. Il faut cependant noter que PARP-1 est également impliquée dans d'autres mécanismes détaillés dans les revues suivantes : Bai, 2015 ; Ji et Tulin, 2013 ; Bai et Canto, 2012 ; Rosado *et al.*, 2013 ; Virag et Szabo, 2002 ; Cho-Park et Steller, 2013 ; De Vos *et al.*, 2012.*

3. Les fonctions de PARP-1 liées à la réparation de l'ADN

De nombreuses cibles potentielles de l'activité de PARylation de PARP-1 sont impliquées dans la réparation de l'ADN (cf. Figure 38 ; Jungmichel *et al.*, 2013), ce qui confirme le rôle fondamental de cette dernière dans les mécanismes de prise en charge des cassures de l'ADN. PARP-1 régule en effet une grande variété de mécanismes de réparation, favorisant aussi bien la réparation des CSBs que des CDBs. Elle est également capable, lorsque l'ADN est endommagé, de soutenir la progression des fourches de réplication par l'intermédiaire de la RH (pour revue : Caldecott, 2014).

3.1 PARP-1 et systèmes de réparation de l'ADN

L'ADN est constamment exposé à des stress génotoxiques endogènes et exogènes, qui incluent les génotoxiques environnementaux, les irradiations et les agents endogènes endommageant l'ADN (Lindahl *et al.*, 1982 ; Lindahl et Wood, 1999 ; Slupphaug *et al.*, 2003 ; Klungland *et al.*, 1999). Ces agents chimiques ou physiques ont pour conséquences l'accumulation de dommages de l'ADN qui doivent être pris en charge par un système de réparation afin de permettre la transmission complète et sans erreurs du matériel génétique à chaque division. Dans ce contexte, PARP-1 est une protéine multifonctionnelle. Sa capacité à se lier aux cassures de l'ADN et à synthétiser des PAR vont permettre son implication dans une grande variété de processus de réparation de l'ADN (pour revues : Beck *et al.*, 2014 ; Tallis *et al.*, 2013 ; De Vos *et al.*, 2012) (Figure 43).



3.1.1 Réparation des CSBs

Les CSBs correspondent à des lésions dans un brin de la double hélice d'ADN et représentent le type de cassures de l'ADN le plus fréquent. Ces cassures peuvent provenir de sources très variées ; néanmoins il existe de nombreux chevauchements entre les enzymes les réparant. En conséquence, les différents mécanismes de réparation des CSBs sont considérés comme des sous-parties d'un mécanisme global de réparation appelé SSBR (pour revue : Caldecott, 2014). Le SSBR peut se dissocier en quatre étapes : ❶ la reconnaissance de la cassure, ❷ la résection des extrémités endommagées, ❸ la restauration du brin d'ADN et enfin ❹ sa ligation.

❶ PARP-1 agit en tant que senseur moléculaire de la CSB. Elle va ainsi être recrutée directement au niveau des cassures reconnues par ses domaines en « doigt de zinc ». Les CSBs générées par des stress exogènes tels que les radiations ionisantes ou bien par des stress endogènes comme des sites abasiques liés au système de réparation du BER ou les bases altérées dans l'ADN telles que la 8oxoG, vont donc induire l'activation de PARP-1 (pour revues : Caldecott, 2014 ; Ciccina et Elledge, 2010). Cette activation conduit à la synthèse subséquente de PAR ce qui constitue un des événements les plus précoces de la réparation des dommages de l'ADN. Il est intéressant de noter que l'activité de PARP est importante pour l'efficacité de la réparation des CSBs suggérant ainsi qu'une quantité dynamique et finement régulée de PAR est primordiale (Fisher *et al.*, 2007 ; Gao *et al.*, 2007). En PARylant des protéines (dont elle-même), PARP-1 va permettre d'altérer l'activité de certaines cibles et va également promouvoir la mise en place d'une « plateforme » de recrutement de protéines interagissant avec le PAR et impliquées dans la réparation et dans le remodelage de la chromatine (Polo *et al.*, 2010 ; Schreiber *et al.*, 2006 ; Chou *et al.*, 2010 ; Ciccina et Elledge, 2010). Par exemple, XRCC1 présente un domaine PBM qui va favoriser son recrutement aux sites de PARylation. XRCC1 ne présente pas d'activité enzymatique intrinsèque mais semble plutôt agir en recrutant un certain nombre de partenaires tels que la DNA polymérase β , PNKP (« *polynucleotide kinase 3'-phosphatase* ») ainsi que la DNA ligase III indirectement via TDP1 (« *tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1* »). La mise en place de cette « plateforme » de recrutement constitue une étape clé pour initier la restauration de la cassure (London, 2015 ; Caldecott, 2014).

❷ Les extrémités 3' et 5' au niveau de la lésion sont généralement « endommagées » et nécessitent donc d'être restaurées. Il s'agit de l'étape la plus diversifiée du mécanisme de réparation du fait de la disponibilité d'une très grande variété d'enzymes qui reflète l'hétérogénéité des dommages aux niveaux des extrémités (Caldecott, 2014).

③ Une fois les extrémités restaurées, le *gap* doit être comblé afin de restaurer la continuité de l'ADN. Cette étape consiste le plus souvent en l'insertion du nucléotide manquant (« *short-patch repair* ») mais certains types de CSBs peuvent nécessiter l'ajout de plusieurs nucléotides (« *long-patch repair* ») induisant la formation d'une extrémité rabattue (« *flap* »). Dans ce cas, FEN1 (« *flap endonuclease 1* ») va retirer le résidu 5' rabattu lors de chaque ajout de nucléotide (pour revue : Finger *et al.*, 2012) permettant ainsi à la polymérase β de progresser. Des données suggèrent que PARP-1 pourrait également être un acteur de cette étape de la réparation des CSBs. En effet, *in vitro* PARP-1 et FEN-1 stimulent l'activité de restauration du brin d'ADN par la polymérase β (Dantzer *et al.*, 2000 ; Prasad *et al.*, 2001).

④ Enfin, le brin d'ADN réparé doit subir une étape de ligation dépendante de l'activité de différentes ligases à ADN qui varient en fonction du type de cassure. Cette étape finale permet de restaurer l'intégrité de l'ADN (Caldecott, 2014).

L'implication de PARP-1 dans le cas particulier du BER reste peu comprise. En effet, ce système de réparation prend en charge les sites abasiques qui ne correspondent pas à des CSBs classiques (Caldecott *et al.*, 2014). Il est donc surprenant de noter une activation de PARP-1 dans le système du BER ; des études ayant même montré que PARP-1 pourrait stimuler celui-ci (Trucco *et al.*, 1998 ; Ding *et al.*, 1992 ; Dantzer *et al.*, 2000). Cependant, des données soutiennent un recrutement possible de PARP-1 au niveau de certains sites abasiques (Khodyreva *et al.*, 2010 ; Wiederhold *et al.*, 2004). Une analyse des différents complexes opérant dans le BER a également identifié PARP-1 comme faisant partie d'un complexe comprenant la polymérase β mais pas APE1, classiquement impliquée dans cette voie de réparation. Il a ainsi été proposé que ce complexe pourrait permettre la restauration des extrémités au cours du BER de manière dépendante de PARP-1 (Prasad *et al.*, 2015).

PARP-1 constitue donc un acteur majeur de la réparation des CSBs permettant principalement d'initier les étapes précoces du SSBR en créant une « plateforme » nécessaire au recrutement de la machinerie de réparation (pour revue : Caldecott, 2014).

3.1.2 « *Non-homologous end joining* » (NHEJ)

Les CDBs constituent les lésions les plus délétères, activant la mort par apoptose si elles ne sont pas réparées ou bien, lorsque les mécanismes apoptotiques sont inhibés, promouvant des réarrangements chromosomiques et une instabilité génétique. Afin de rapidement prendre en charge ce type de lésion, il existe plusieurs mécanismes de réparation. Certains seront très contraignants mais n'induiront pas d'erreurs, alors que d'autres gagneront en flexibilité au détriment de leur fiabilité (pour revue : Ciccia et Elledge, 2010).

Le NHEJ (pour revues : Williams *et al.*, 2014 ; Bétermier *et al.*, 2014) se dissocie selon deux voies : le NHEJ classique (c-NHEJ) dépendant des facteurs Ku, DNA-PKcs et Lig4 et le NHEJ alternatif (alt-NHEJ) principalement actif dans des cellules déficientes pour le c-NHEJ (Chiruvella *et al.*, 2013 ; Kasperek et Humphrey, 2011 ; Mladenov et Iliakis, 2011 ; Ciccio et Elledge, 2010).

Le rôle précis de PARP-1 dans le c-NHEJ demeure complexe. Différentes études ont proposé une implication de PARP-1 dans cette voie, essentiellement car elle interagit avec l'hétérodimère Ku (Ku70 et Ku80) et DNA-PKcs, responsables respectivement de la reconnaissance des CDBs et de leur stabilisation lors du c-NHEJ (Spagnolo *et al.*, 2012 ; Galande et Kohwi-Shigematsu, 1999 ; Paddock *et al.*, 2011 ; Ciccio et Elledge, 2010). En dépit de ces observations, PARP-1 ne semble pas capable d'influencer le c-NHEJ *in vivo* (Yang *et al.*, 2004 ; Noël *et al.*, 2003). De plus, la majorité des études biochimiques évoquant PARP-1 dans le NHEJ semble plutôt suggérer un rôle de cette protéine durant la voie alternative (Caldecott, 2014).

PARP-1 pourrait néanmoins influencer *in vivo* sur le c-NHEJ en participant au choix entre c-NHEJ et alt-NHEJ. En effet, PARP-1 et Ku étant toutes deux capables d'interagir avec les CDBs, il a été proposé que les deux protéines pourraient être en compétition pour se fixer sur la CDB. Cette compétition permettrait ainsi, en fonction de la protéine recrutée, de favoriser l'une ou l'autre des deux voies du NHEJ. Ku présentant une affinité extrêmement forte pour les CDBs, c'est elle qui va se fixer en priorité et c'est donc le c-NHEJ qui va être privilégié et constituer la voie majoritaire (Wang *et al.*, 2006 ; Paddock *et al.*, 2011). Cependant, dans certaines conditions, notamment en absence de la machinerie du c-NHEJ, PARP-1 va être préférentiellement recrutée et va ainsi favoriser l'initiation du alt-NHEJ (Wang *et al.*, 2006 ; Audebert *et al.*, 2008 ; Mansour *et al.*, 2010). Lors d'un stress de réplication PARP-1 pourrait également gêner le c-NHEJ pour favoriser la RH (*cf. section suivante*).

Le rôle de PARP-1 dans le NHEJ semble donc plutôt lié à la voie alternative de ce mécanisme. Les premières données évoquant un rôle de PARP-1 dans le alt-NHEJ proviennent de l'observation d'un ralentissement de la réparation des CDBs dans des cellules déficientes à la fois pour PARP-1 et pour Ku (Wang *et al.*, 2006 ; Mansour *et al.*, 2010). Il a ensuite été montré que la fixation de PARP-1 et son activation subséquente promeut le recrutement de MRE11 (« *meiotic recombination 11* ») au niveau de la cassure (Haince *et al.*, 2008) permettant ainsi l'initiation d'une résection courte, première étape du alt-NHEJ. L'histone H1, un substrat de PARP-1, stimule également la DNA ligase III, enzyme importante pour l'étape de restauration du brin au cours du alt-NHEJ (Rosidi *et al.*, 2008).

En adéquation avec son rôle dans le alt-NHEJ, PARP-1 participe également au mécanisme de « *class switch recombination* » (CSR) dans les lymphocytes B (Robert *et al.*, 2009). Le CSR est un

processus par lequel les cellules B en prolifération réarrangent la région constante des gènes codant pour les chaînes lourdes des immunoglobulines, permettant ainsi de changer une classe d'immunoglobuline par une autre (pour revue : Stavnezer *et al.*, 2008). Ce mécanisme passe par la formation d'une CDB et par sa prise en charge et sa réparation par le NHEJ. PARP-1 est activée spécifiquement en réponse à des cassures induites par l'AID (« *activation induced cytidine deaminase* ») qui désamine la cytidine incorporée dans l'ADN en uracile activant le mécanisme du BER. PARP-1 promeut alors la réparation par le alt-NHEJ au niveau des extrémités endommagées de la chaîne lourde des immunoglobulines (Robert *et al.*, 2009), probablement en entrant en compétition avec la protéine Ku (Wang *et al.*, 2006).

Selon un mécanisme similaire à sa prise en charge des CSBs au cours du SSBR, PARP-1 est donc impliquée dans les étapes précoces du NHEJ, et plus particulièrement dans la reconnaissance des CDBs, favorisant ensuite la voie alternative de ce mécanisme (pour revue : Beck *et al.*, 2014).

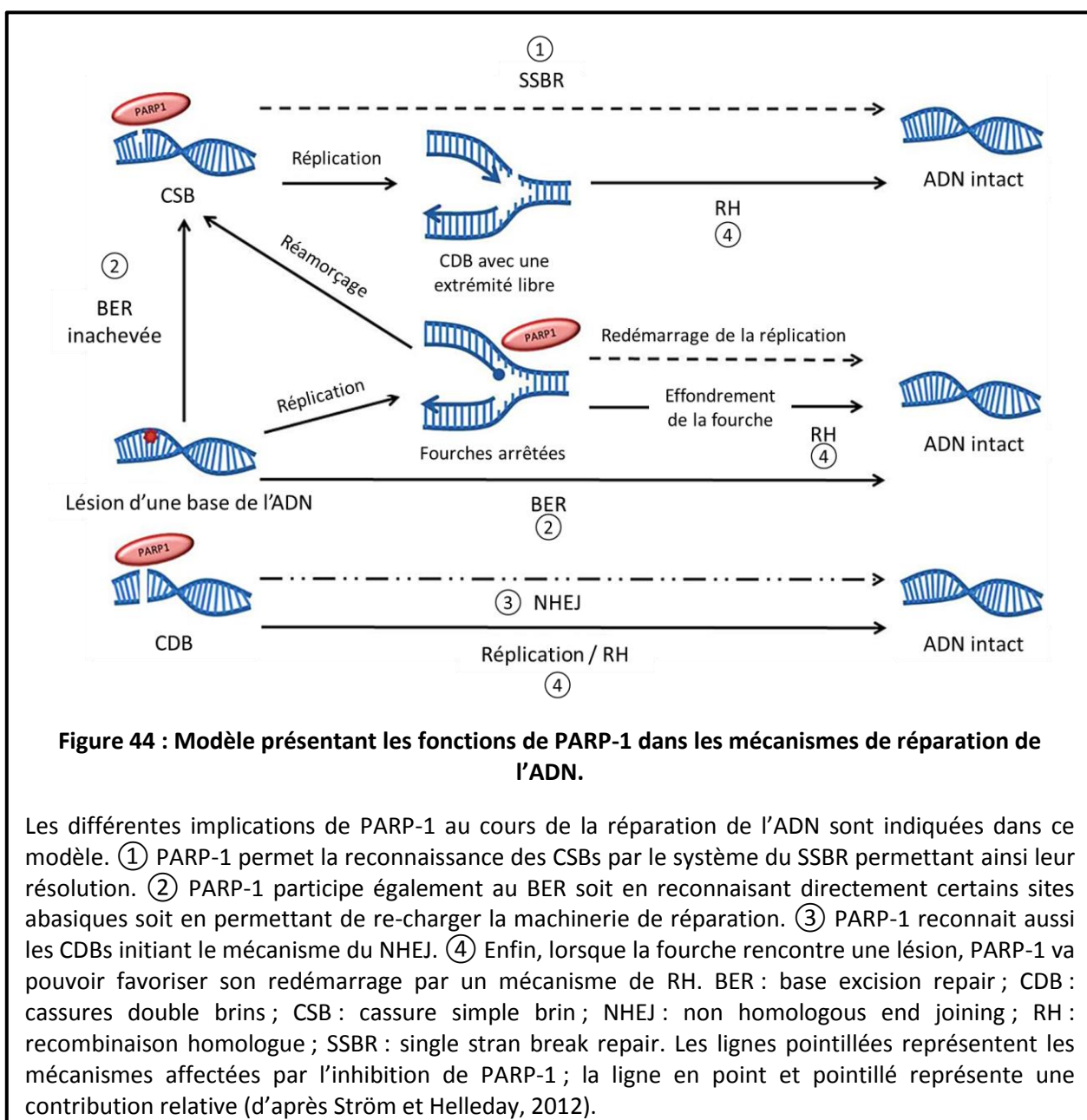
3.1.3 Recombinaison homologue / réplication

Bien que PARP-1 ne semble pas participer directement à l'exécution de la RH, des données soutiennent l'idée qu'elle opère activement dans le redémarrage des fourches arrêtées persistantes médié par la RH (pour revue : Beck *et al.*, 2014). En effet, l'interaction de PARP-1 avec des fourches de réplication bloquées induit son activation, et les cellules déficientes pour PARP-1 présentent une sensibilité à l'HU révélée par des arrêts et des effondrements de fourches de réplication, évoquant une incapacité à redémarrer les fourches via la RH (Bryant *et al.*, 2009 ; Yang *et al.*, 2004). Ces études suggèrent un rôle de PARP-1 dans les événements de RH liés à la réplication. Néanmoins, le rôle de PARP-1 dans ce contexte reste controversé étant donné les résultats contradictoires présents dans la littérature, dépendants surtout du degré d'arrêt des fourches de réplication.

Ainsi, lors d'un blocage sévère des fourches de réplication associé à des CDBs, PARP-1 promeut le recrutement, dépendant du PAR, de MRE11 et la résection des extrémités de l'ADN, étape nécessaire à l'assemblage du nucléofilament RAD51 et au mécanisme de RH (Haince *et al.*, 2008 ; Bryant *et al.*, 2009). PARP-1 pourrait également gêner l'association des complexes Ku70-Ku80 et XRCC4-DNA ligase IV au niveau des extrémités de l'ADN favorisant ainsi la réparation des CDBs par RH, au détriment du c-NHEJ (Hohegger *et al.*, 2006). Lors d'un traitement avec de la CPT, PARP-1 pourrait faciliter la progression des fourches de réplication en permettant leur redémarrage par RH. Ce mécanisme impliquerait la PARylation de Ku70 ce qui induirait son relargage de l'ADN permettant ainsi la mise en place de la machinerie de RH (Sugimura *et al.*, 2008). Enfin, la quantité de PAR est primordiale pour stimuler ces événements de RH puisqu'en absence de PARG, celui-ci s'accumule et

empêche la résection des extrémités de l'ADN, ainsi que la protection de l'ADN simple brin par RPA et la prise en charge subséquente par la RH (Illuzi *et al.*, 2014).

A l'inverse, d'autres données de la littérature supposent un rôle anti-recombinogène de PARP-1. En effet, l'accumulation de foyers RPA ou RAD51 ainsi que l'augmentation des SCEs dans les cellules déficientes en PARP-1, en condition basale ou après un traitement limité à l'HU, laissent penser que PARP-1 pourrait réguler négativement des événements de RH (Yang *et al.*, 2004 ; Orsburn *et al.*, 2010 ; Schultz *et al.*, 2003). En adéquation avec ces résultats, PARP-1 a été décrite dans le contexte d'une fourche arrêtée de manière transitoire et lorsqu'il n'y a pas de formation de CDBs, comme prévenant la résection excessive par MRE11 (Ying *et al.*, 2012).



Les rôles de PARP-1 dans les processus de RH semblent donc très dépendants du type de stress imposé. Ainsi, en fonction des conditions, PARP-1 posséderait des fonctions pro- ou anti-recombinogènes favorisant ou non les événements de RH liés à la réplication (Beck *et al.*, 2014).

En conclusion, PARP-1 participe à plusieurs mécanismes de réparation de l'ADN, favorisant ainsi la survie des cellules en conditions de stress. Elle se lie aux CSBs et aux CDBs, ce qui permet leur prise en charge respective par le système du SSBR (① et ② de la figure 44) et par le NHEJ (③ de la figure 44). De plus, pendant un stress de réplication, elle soutient la progression des fourches de réplication en favorisant leur redémarrage grâce à un mécanisme dépendant de la RH (④ de la figure 44).

3.2 PARP-1 et remodelage de la chromatine

La réorganisation de la chromatine est une étape primordiale dans la réponse aux cassures de l'ADN, permettant ainsi le recrutement efficace de la machinerie de réparation aux sites de dommages. La plasticité de la chromatine est régulée par une variété de facteurs incluant les modifications post-traductionnelles (telles que la PARylation, l'acétylation, la phosphorylation, la SUMOylation et l'ubiquitination), les protéines de remodelage de la chromatine dépendantes de l'ATP et la modification des histones, ou encore l'inclusion de variants (pour revues : Jeggo et Downs, 2014 ; Polo, 2015).

PARP-1 est capable d'influer sur la compaction de l'ADN selon différents modes d'actions. Un de ces mécanismes consiste à moduler la stabilité des nucléosomes. PARP-1 modifie ainsi l'interaction entre les histones et l'ADN. En effet, l'attraction entre les phosphates chargés négativement de l'ADN et les résidus alcalins des histones est largement responsable de leur association et conditionne donc la condensation de la chromatine. De manière intéressante, l'histone H1, une cible de PARP-1, possède une affinité plus forte pour le PAR que pour l'ADN. L'ajout de PAR chargé négativement sur l'histone H1 va donc conduire à son relargage de l'ADN et à la décondensation de la chromatine, rendant cette dernière accessible à la machinerie de réparation. D'autres histones ont été décrites comme étant régulées par PARylation telles que H2A ou H2B (D'Amours *et al.*, 1999 ; Poirier *et al.*, 1982).

PARP-1 participe également au recrutement de différentes protéines modifiant la compaction de la chromatine telles que des enzymes de remodelage de la chromatine. Parmi celles-ci, l'exemple d'ALC1 (« *Amplified in Liver Cancer 1* ») est le plus caractéristique. ALC1 est une protéine « *SNF2-like ATPase* » contenant un macrodomaine nécessaire à son interaction avec une forme PARylée de

PARP-1 (Gottschalk *et al.*, 2009 ; Gottschalk *et al.*, 2012). Cette interaction permet le recrutement rapide d'ALC1 aux sites de dommages de l'ADN formant ainsi un intermédiaire de nucléosome (Ahel *et al.*, 2009 ; Gottschalk *et al.*, 2009) ce qui induit la relaxation de la chromatine nécessaire à la réparation des cassures. PARP-1 est également capable de réguler SMARCA5/SNF2H qui constitue la sous-unité catalytique du complexe de remodelage de la chromatine ISWI. Celle-ci est aussi recrutée aux sites de CDBs de manière dépendante de PARP-1 ; la déplétion de PARP-1 étant en effet à l'origine d'une diminution drastique de l'accumulation de SMARCA5 aux sites de dommages (Smeenk *et al.*, 2013). De manière intéressante, PARP-1 est nécessaire à l'interaction de SMARCA5 avec l'E3 ubiquitine ligase RNF168 (Doil *et al.*, 2009), permettant ainsi leur interaction sur la chromatine endommagée (Smeenk *et al.*, 2013). PARP-1 régule également l'E3 ubiquitine ligase CHFR qui contient un domaine PBZ, permettant son interaction avec le PAR ainsi que son recrutement aux sites de dommages de l'ADN (Ahel *et al.*, 2008). Cette interaction module les étapes précoces de réparation en ubiquitinant PARP-1 et probablement des histones PARylées, ce qui promeut la relaxation de la chromatine (Kashima *et al.*, 2012 ; Liu *et al.*, 2013). Ces données suggèrent une association fonctionnelle et physique entre la PARylation, les enzymes de remodelage de la chromatine et les cascades de signalisation initiées par les ubiquitines ligases (Tallis *et al.*, 2013).

PARP-1 peut aussi réguler la compaction de la chromatine par l'intermédiaire du recrutement de chaperonnes d'histones telles que la protéine APLF capable d'interagir avec le PAR. Ainsi, le domaine PBZ d'APLF permet son recrutement aux sites de dommages de l'ADN (Ahel *et al.*, 2008 ; Iles *et al.*, 2007 ; Mehrotra *et al.*, 2011b), promouvant ainsi l'enlèvement d'histones et le recrutement de variants d'histones tels que Macro H2A1 conduisant finalement à faciliter la réparation (Mehrotra *et al.*, 2011b ; Timinszky *et al.*, 2009). De manière intéressante, APLF interagit avec ALC1, ce qui stimule l'interaction de cette dernière avec la chromatine (Mehrotra *et al.*, 2011b).

Sur la base de ces résultats, le modèle suivant a donc été proposé : l'activation de PARP-1 après sa liaison aux sites de dommages de l'ADN (① de la figure 45) conduit au recrutement de différentes enzymes de remodelage de la chromatine (② de la figure 45) ce qui contribue à la relaxation de cette dernière. En parallèle, la PARylation extensive des protéines telles que PARP-1 et de certaines histones induit leur relargage de l'ADN (③ de la figure 45), stimulant également la relaxation de la chromatine. Ces mécanismes vont ainsi favoriser la réparation de l'ADN en améliorant l'accessibilité des cassures à la machinerie de réparation (Tallis *et al.*, 2013).

PARP-1 va donc fonctionner à l'interface entre les mécanismes de réparation de l'ADN et de remodelage de la chromatine, favorisant à la fois l'accessibilité et le recrutement de la machinerie de réparation de l'ADN.

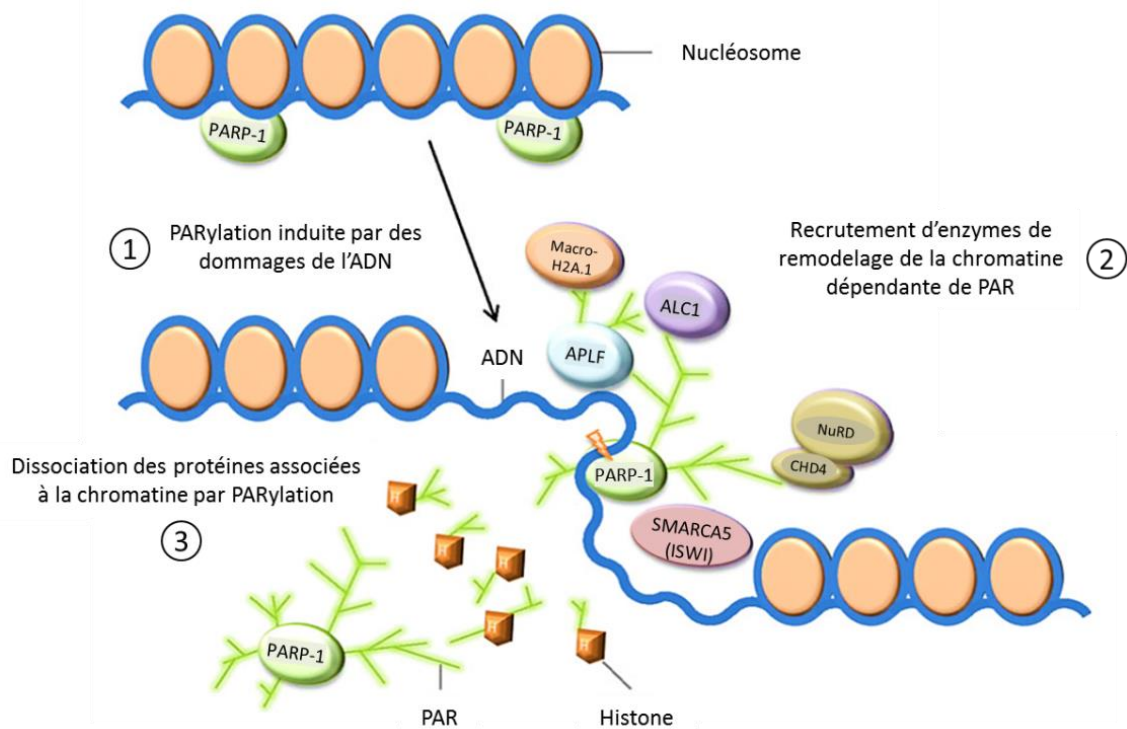


Figure 45 : Implication de PARP-1 dans la réorganisation de la chromatine aux sites de cassures de l'ADN.

① L'activation de la PARylation après liaison de PARP-1 aux sites de dommages de l'ADN conduit ② au recrutement de différentes enzymes de remodelage de la chromatine contribuant ainsi à la relaxation de la chromatine. En parallèle, ③ la PARylation extensive des protéines telles que PARP-1 et de certaines histones conduit à leur relargage de l'ADN, favorisant également la relaxation de la chromatine (d'après Tallis *et al.*, 2013).

4. Les fonctions de PARP-1 liées à la cancérogénèse

De nombreuses études s'accordent à dire que PARP-1 constitue une cible attractive pour des traitements anti-tumoraux. En effet, les cellules tumorales présentent un métabolisme altéré et sont donc très dépendantes des mécanismes de réparation de l'ADN pour leur survie. Néanmoins, le rôle de PARP-1 dans la réparation des cassures n'est pas la seule fonction pouvant être ciblée pour traiter les tumeurs (pour revues : Weaver et Yange, 2013 ; Bai, 2015).

Il devient effectivement clair que certains rôles de PARP-1, indépendants de la réparation de l'ADN, influencent les « caractéristiques du cancer » proposées par Hanahan et Weinberg (Hanahan et Weinberg, 2011) (Figure 46). Parmi ces fonctions, on peut noter la régulation de l'inflammation médiée par NF- κ B, la mort cellulaire et le métabolisme énergétique, la progression tumorale et l'invasion médiée par ERK, la régulation du cycle cellulaire, la transcription de gènes ou encore la signalisation par les hormones sexuelles (Weaver et Yange, 2013).

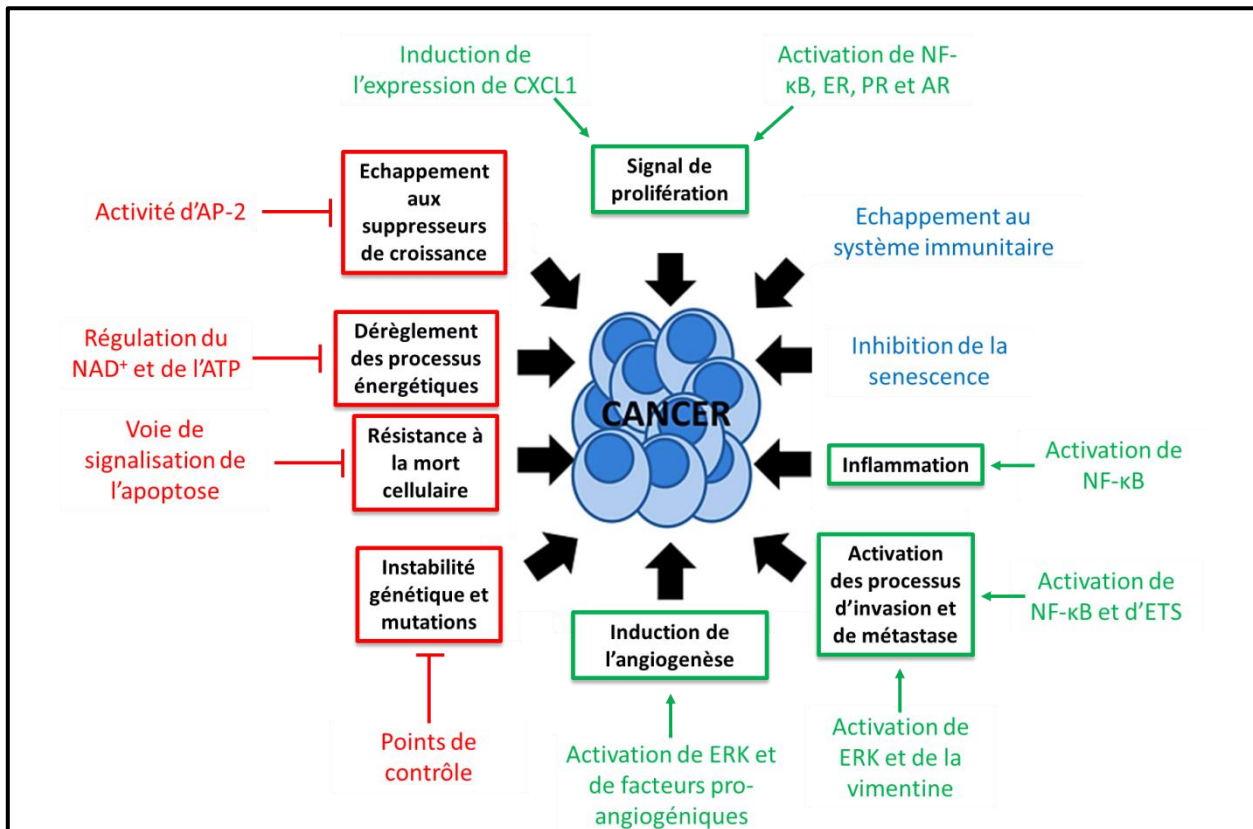


Figure 46 : Fonctions de PARP-1 influençant la cancérogénèse.

Les « caractéristiques des cellules cancéreuses » proposées par Hanahan et Weinberg sont représentées ici. Les rôles activateurs (en vert) ou inhibiteurs (en rouge) dans lesquelles PARP-1 est impliquée et influençant des « caractéristiques des cellules cancéreuses » sont indiqués (adapté de Weaver et Yange, 2013).

4.1 PARP-1 et inflammation

De multiples cancers présentent des altérations de la voie NF-κB (« *nuclear factor κB* ») ce qui conduit à son activation constitutive (Gilmore *et al.*, 2002). La voie NF-κB regroupe une famille de facteurs de transcription incluant RelA/p65, RelB, c-Rel, p50 et p52, pouvant interagir sous forme d'homo- ou d'hétérodimère. En fonction de la composition du dimère, ces facteurs de transcription posséderont des affinités pour l'ADN et des spécificités pour des promoteurs différents. L'hétérodimère p50/p65 représente le dimère le plus classique impliqué dans l'activation de la voie NF-κB. En absence de stimulus, des protéines inhibitrices, telles que la protéine IKKγ (NEMO), se fixent sur le dimère NF-κB et le séquestrent dans le cytoplasme. L'activation de cette voie de signalisation entraîne la dégradation de ces protéines par le protéasome permettant ainsi la translocation du dimère NF-κB dans le noyau et l'activation transcriptionnelle des gènes de l'inflammation (pour revue : Espinosa *et al.*, 2015). Bien que la signalisation par NF-κB soit responsable de l'activation du système immunitaire

pour cibler et éliminer les cellules cancéreuses, l'inflammation chronique qui en résulte peut également favoriser la cancérogénèse (Hoesel et Schmid, 2013) (Figure 46).

L'activation de NF- κ B peut être régulée par PARP-1 selon deux mécanismes distincts :

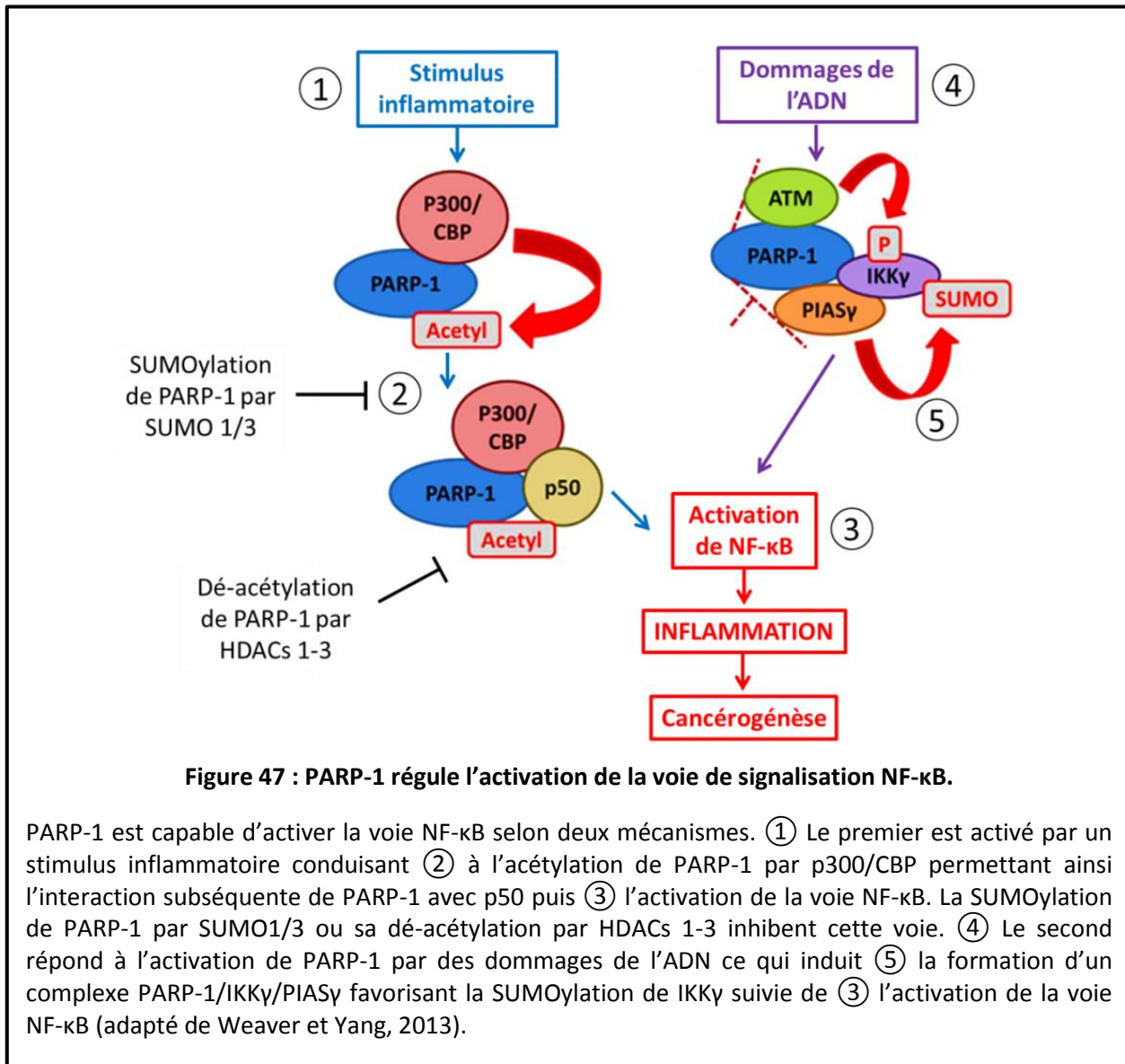
① En réponse à un stimulus inflammatoire (① de la figure 47), PARP-1 interagit directement avec les histones acétyl-transférases p300 et CPB (« CREB-binding protein »). Celles-ci vont acétyler PARP-1 conduisant ainsi au recrutement de la sous-unité activatrice p50 sur le complexe PARP-1/p300-CPB (② de la figure 47). Ensemble, p50 et PARP-1 vont ensuite induire de manière synergique l'activation de la voie NF- κ B (③ de la figure 47) (Hassa *et al.*, 2003 ; Hassa *et al.*, 2005). La SUMOylation du domaine central de PARP-1 par SUMO1/3 inhibe ce mécanisme (Messner *et al.*, 2009), tout comme les HDACs 1-3 qui vont dé-acétyler PARP-1 ce qui déstabilise le complexe PARP-1/p50 (Hassa *et al.*, 2005).

② PARP-1 peut également activer la voie NF- κ B via son activation par des dommages de l'ADN (④ de la figure 47). Ainsi, l'auto-PARylation de PARP-1 promeut la formation d'un complexe contenant IKK γ (NEMO), PIAS γ et ATM. IKK γ possède en effet un domaine de liaison au PAR qui va lui permettre d'interagir avec PARP-1 PARylée ce qui favorise une conformation nécessaire à sa SUMOylation par PIAS γ et probablement à sa phosphorylation par ATM (⑤ de la figure 47). Cela va finalement conduire à la translocation de NF- κ B dans le noyau et donc à l'activation de la voie NF- κ B (③ de la figure 47) (Stilman *et al.*, 2009).

En ce qui concerne la PARylation directe de NF- κ B, les données sont contradictoires décrivant, en fonction des études, une augmentation, une diminution ou n'affectant pas la liaison à l'ADN de NF- κ B (Chang et Alvarez-Gonzalez, 2001 ; Zerfaoui *et al.*, 2010 ; Veuger *et al.*, 2009).

L'activation de la voie NF- κ B par PARP-1 conduit à un état inflammatoire corrélé à la production de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF α , IL-6, INF γ , E-selectine et ICAM-1 ainsi qu'à une augmentation de l'expression de la NOS (« nitric oxide synthase ») (Haddad *et al.*, 2006 ; Jijon *et al.*, 2000 ; Naura *et al.*, 2009). De manière intéressante, l'utilisation d'inhibiteur de PARP-1 permet d'atténuer l'accumulation de ces facteurs répondant à un stimulus inflammatoire (Haddad *et al.*, 2006 ; Jijon *et al.*, 2000). De plus, l'inhibition de PARP-1 permet de limiter les effets néfastes liés à l'inflammation induits par la chimiothérapie (Korkmaz *et al.*, 2008), confirmant ainsi l'intérêt thérapeutique des inhibiteurs de PARP-1 en combinaison avec d'autres traitements.

Enfin, l'activation de NF- κ B par PARP-1 ne se limite pas à favoriser l'inflammation, elle permet également de stimuler la prolifération (Martin-Oliva *et al.*, 2004) et la formation de métastase (Ohanna *et al.*, 2011) médiées par NF- κ B (Figure 46).



4.2 PARP-1, mort cellulaire et métabolisme énergétique

Les cellules cancéreuses sont caractérisées par une prolifération excessive, une inhibition des signaux de mort cellulaire et par un métabolisme dérégulé. Ces caractéristiques sont souvent médiées par une activité mitochondriale aberrante couplée à une inactivation des voies apoptotiques. PARP-1 régule un certain nombre de mécanismes énergétiques et de mort cellulaire qui permet de déterminer le destin des cellules, affectant au final la prolifération tumorale et la

réponse thérapeutique (Weaver et Yang, 2013). Lors de son hyper-activation due à des dommages extensifs de l'ADN, PARP-1 est capable d'induire la mort cellulaire selon différents mécanismes :

① Comme cité auparavant, la synthèse excessive de polymère entraîne la déplétion en ATP, conduisant ainsi à une privation énergétique pouvant conduire à la mort par nécrose (*cf. section 2.3.2*) (① de la figure 48) (Decker et Muller, 2002 ; Bouchard *et al.*, 2003). PARP-1 régule également la voie classique de la nécrose en promouvant l'activation de deux MAP-kinases, MPK1 et JNK (Racz *et al.*, 2010 ; Szanto *et al.*, 2009). Il est intéressant de noter que JNK1 est capable à son tour de phosphoryler PARP-1 favorisant son activation et créant ainsi une boucle de rétrocontrôle positif (Zhang *et al.*, 2007).

② La mort par déplétion énergétique n'est cependant pas le seul type de mort cellulaire régulée par l'activité de PARP-1. En effet, la déplétion en ATP, résultant de l'hyper-activation de PARP-1, stimule également l'AMPK (« *AMP-activated protein kinase* ») tout en inhibant mTOR, promouvant ainsi l'autophagie (② de la figure 48).

③ En outre, l'hyper-activation de PARP-1 et l'accumulation de PAR induisent la translocation de ce dernier dans le cytoplasme où il va interagir avec la surface mitochondriale. Le PAR se lie alors avec l'AIF (« *apoptosis inducing factor* ») conduisant à son relargage et à sa translocation dans le noyau. Celle-ci entraîne finalement la fragmentation de l'ADN et conduit à la mort cellulaire par un mécanisme dépendant de PARP-1 appelé « *parthanatos* » (③ de la figure 48) (Wang *et al.*, 2011).

④ Afin de prévenir ces événements, les caspases actives vont cliver PARP-1 en deux fragments : l'un de 89 kDa contenant la région C-terminale et présentant une activité catalytique faible et l'autre de 24 kDa capable d'inhiber l'activité catalytique de PARP-1 non clivée. Le NAD⁺ n'est donc plus utilisé par PARP-1 ce qui prévient sa resynthèse et la déplétion en ATP pour finalement favoriser la mort par apoptose, moins délétère pour la cellule (④ de la figure 48) (Soldani et Scovassi, 2002 ; Ivana Scovassi et Diederich, 2004 ; Simbulan-Rosenthal *et al.*, 1998). L'inactivation de la caspase 8 par le PAR peut néanmoins altérer l'activation de cette voie, contrecarrant ainsi la voie apoptotique (Yuan *et al.*, 2013). En réponse à des dommages de l'ADN, PARP-1 active est également impliquée dans les étapes précoces de l'initiation de l'apoptose en stabilisant p53 et en favorisant son activité (④ de la figure 48) (Wesierska-Gadek *et al.*, 2005).

Lors de son hyper-activation, PARP-1 est donc capable de réguler un certain nombre de mécanismes de mort cellulaire. L'activation de ces voies permet de favoriser la mort des cellules ayant subi une quantité excessive de dommages. En régulant ces différentes voies PARP-1 prévient

ainsi la résistance à la mort cellulaire et les altérations du métabolisme énergétique caractéristiques des cellules cancéreuses (Figure 46).

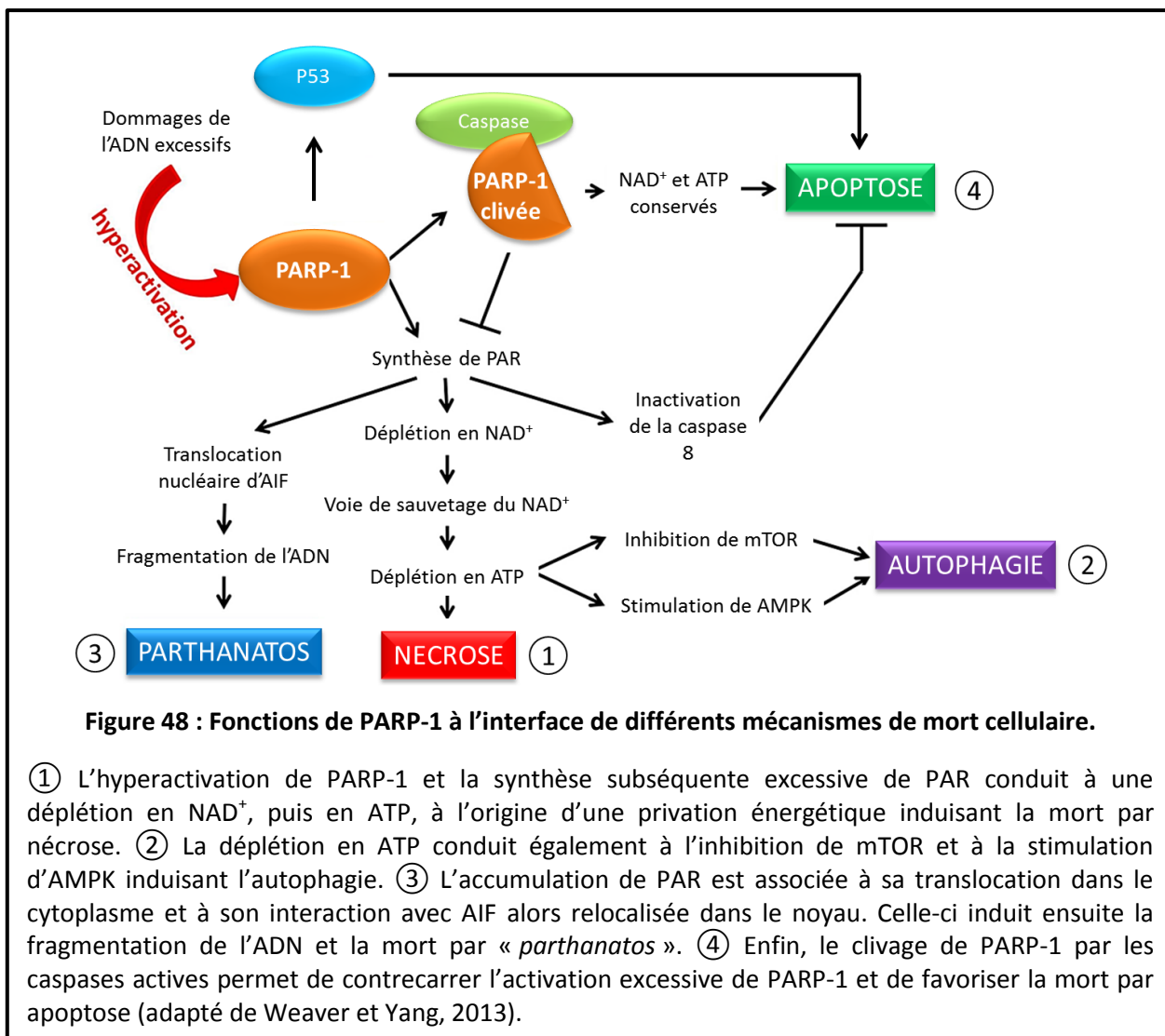


Figure 48 : Fonctions de PARP-1 à l'interface de différents mécanismes de mort cellulaire.

① L'hyperactivation de PARP-1 et la synthèse subséquente excessive de PAR conduit à une déplétion en NAD⁺, puis en ATP, à l'origine d'une privation énergétique induisant la mort par nécrose. ② La déplétion en ATP conduit également à l'inhibition de mTOR et à la stimulation d'AMPK induisant l'autophagie. ③ L'accumulation de PAR est associée à sa translocation dans le cytoplasme et à son interaction avec AIF alors relocalisée dans le noyau. Celle-ci induit ensuite la fragmentation de l'ADN et la mort par « parthanatos ». ④ Enfin, le clivage de PARP-1 par les caspases actives permet de contrecarrer l'activation excessive de PARP-1 et de favoriser la mort par apoptose (adapté de Weaver et Yang, 2013).

4.3 PARP-1 et angiogenèse/métastase

Les ERKs représentent une famille de MAP kinases impliquées dans la mort cellulaire mais également dans la progression tumorale, l'angiogenèse et la formation de métastases. L'activation de ERK constitue un pivot central dans la survie des cellules cancéreuses promouvant l'induction de facteurs anti-apoptotiques, tout en inhibant l'activité des caspases et l'expression de facteurs pro-apoptotiques (Boucher *et al.*, 2000). Ainsi, l'inhibition de cette voie conduit à la suppression de la prolifération des tumeurs ovariennes (Kandala *et al.*, 2012), réduit le potentiel métastatique du mélanome (Kim *et al.*, 2012) et augmente la sensibilité des cellules à des agents cytotoxiques (Kohn *et al.*, 2011).

PARP-1 participe à l'activation de la voie ERK en agissant sur l'activité de la protéine ERK2. En effet, l'interaction de PARP-1 avec ERK2 phosphorylée (pERK2) stimule l'auto-PARylation de PARP-1 et induit l'activation de pERK2. Celle-ci va alors phosphoryler des facteurs de transcription à l'origine de l'expression de certains gènes cibles de la voie ERK (Cohen-Armon *et al.*, 2007). L'inhibition de PARP-1 est ainsi associée à une perte de la stimulation de ERK2 ayant pour conséquence la chute de l'activité de certains facteurs pro-angiogéniques tels que VEGF (« *vascular endothelial growth factor* »), SDC-4 (« *transmembrane signaling protein syndecan-4* »), PECAM1/CD31 (« *platelet/endothelial cell adhesion molecule* »), et HIF (« *hypoxia inducible factor* »). En conséquence, en absence de PARP-1, l'angiogenèse et l'inflammation sont diminuées (Pyriochou *et al.*, 2008 ; Lacal *et al.*, 2009 ; Tentori *et al.*, 2008 ; Martin-Oliva *et al.*, 2006 ; Rajesh *et al.*, 2006).

De plus, la voie ERK est stimulée par la transcription de la vimentine, elle-même dépendante de PARP-1. La vimentine est un filament intermédiaire pro-angiogénique surexprimé dans le réseau vasculaire des tumeurs et impliqué dans la transition épithélio-mésenchymateuse caractéristique des métastases (Rodriguez *et al.*, 2013). Dans un modèle murin, l'inhibition chimique de PARP-1 est ainsi corrélée à une inversion de cette transition, et à une diminution des métastases dérivées d'un mélanome (Rodriguez *et al.*, 2013).

Grâce à sa capacité à réguler la voie ERK, PARP-1 stimule donc l'angiogenèse et la transition épithélio-mésenchymateuse impliquées dans la formation de métastases et dans le développement tumoral (Figure 46).

4.4 PARP-1 et régulation du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est ponctué de différents points de contrôle assurant des arrêts potentiels à des étapes critiques. D'abord décrits comme des régulateurs du cycle cellulaire en réponse à différents stress génotoxiques, ces points de contrôle ont ensuite été associés au processus de prévention de la cancérogénèse en agissant en tant que gardiens contre la « sur-réplication de l'ADN ». En effet, la prolifération intense des cellules tumorales ne résultent pas que de la diminution de l'induction de la mort cellulaire mais dépend également d'une régulation incorrecte du cycle cellulaire, permettant ainsi le contournement des signaux d'arrêt de prolifération (pour revues : Wang *et al.*, 2015 ; Jeggo et Löbrich, 2006).

Le point de contrôle mitotique est responsable de la ségrégation correcte des chromosomes et est requis pour la survie cellulaire. Les cellules présentant un point de contrôle mitotique affaiblit

peuvent survivre mais présentent une ségrégation incorrecte des chromosomes ce qui favorise l'instabilité génétique et l'aneuploïdie (pour revue : Burgess *et al.*, 2014).

Durant la mitose, PARP-1 se localise aux centromères et PARyle certaines histones centromériques où des protéines localisées aux centrosomes (Saxena *et al.*, 2002 ; Kanai *et al.*, 2003). PARP-1 est également responsable de la PARylation de p53 qui est impliquée dans la régulation de la duplication des centrosomes et dans la stabilité des chromosomes (Kanai *et al.*, 2003). Ainsi, l'inhibition de PARP-1 est associée à de l'instabilité génétique caractérisée par un point de contrôle mitotique affaibli, une hyper-amplification des centrosomes et de l'aneuploïdie, ce qui constitue des caractéristiques classiques des cellules tumorales (① de la figure 50) (Kanai *et al.*, 2003 ; Halappanavar et Shah, 2004 ; Tong *et al.*, 2007 ; Yang *et al.*, 2009).

En outre, PARP-1 a été décrite comme interagissant avec CHFR. Il s'agit d'une E3 ubiquitine ligase capable d'ubiquitiner PARP-1 et d'induire sa dégradation (*cf. section 2.3.1*). Lors d'un stress mitotique, l'activation de PARP-1 et son auto-modification vont stimuler son interaction avec CHFR conduisant ainsi à la poly-ubiquitination de PARP-1 et à sa dégradation. De manière intéressante, la dégradation de PARP-1 promeut l'arrêt du cycle cellulaire en prophase. Les auteurs ont alors proposé qu'en réponse à un stress mitotique, la dégradation de PARP-1 pourrait participer à l'arrêt des cellules en mitose par un mécanisme encore inconnu (② de la figure 50) (Kashima *et al.*, 2012).

Plus récemment, une étude a identifié un rôle de PARP-1 dans la régulation de Chk1, une protéine primordiale pour l'activation du point de contrôle de phase S (Min *et al.*, 2013). Lors d'un traitement avec de l'HU, l'absence ou l'inhibition de PARP-1 déstabilise la liaison de Chk1 à la chromatine compromettant son activation optimale et l'arrêt de la synthèse d'ADN après un stress. Ces données suggèrent que l'activité de PARP-1 est importante pour l'activation correcte du point de contrôle de phase S médiée par Chk1. Au niveau moléculaire, une analyse *in silico* a identifié un site potentiel de liaison de Chk1 au PAR (PbR : « *PAR-binding region* ») situé dans son domaine N-terminal. Ce domaine est nécessaire à l'interaction de Chk1 avec le PAR *in vivo* et l'absence de ce dernier compromet l'activation complète du point de contrôle de phase S, reproduisant les effets d'une inhibition de PARP-1 (Min *et al.*, 2013).

Sur la base de ces résultats, les auteurs ont proposé le modèle suivant. En réponse à l'HU, l'arrêt des fourches de réplication conduit au recrutement de PARP-1 et à son activation (① de la figure 49), la forme inactive de Chk1 étant déjà présente. L'activation de PARP-1 et la synthèse de polymère subséquente vont permettre de stabiliser Chk1 en créant une interaction entre le domaine PbR de Chk1 et le PAR (② de la figure 49). La kinase ATR, protéine essentielle du point de contrôle de phase

S et responsable de l'activation de Chk1 en réponse à un stress de réplication, va ensuite être recrutée au niveau de la fourche. La stabilisation de Chk1 via sa liaison au PAR va favoriser l'activation complète de Chk1 par ATR (③ de la figure 49). La protéine Chk1 active va ensuite se dissocier de la fourche et pourra induire la signalétique d'activation du point de contrôle de phase S (④ de la figure 49). En absence de PARP-1, Chk1 ne sera pas stabilisée et son activation sera compromise conduisant ainsi à une activation incomplète du point de contrôle de phase S en réponse à un stress de réplication (Min *et al.*, 2013).

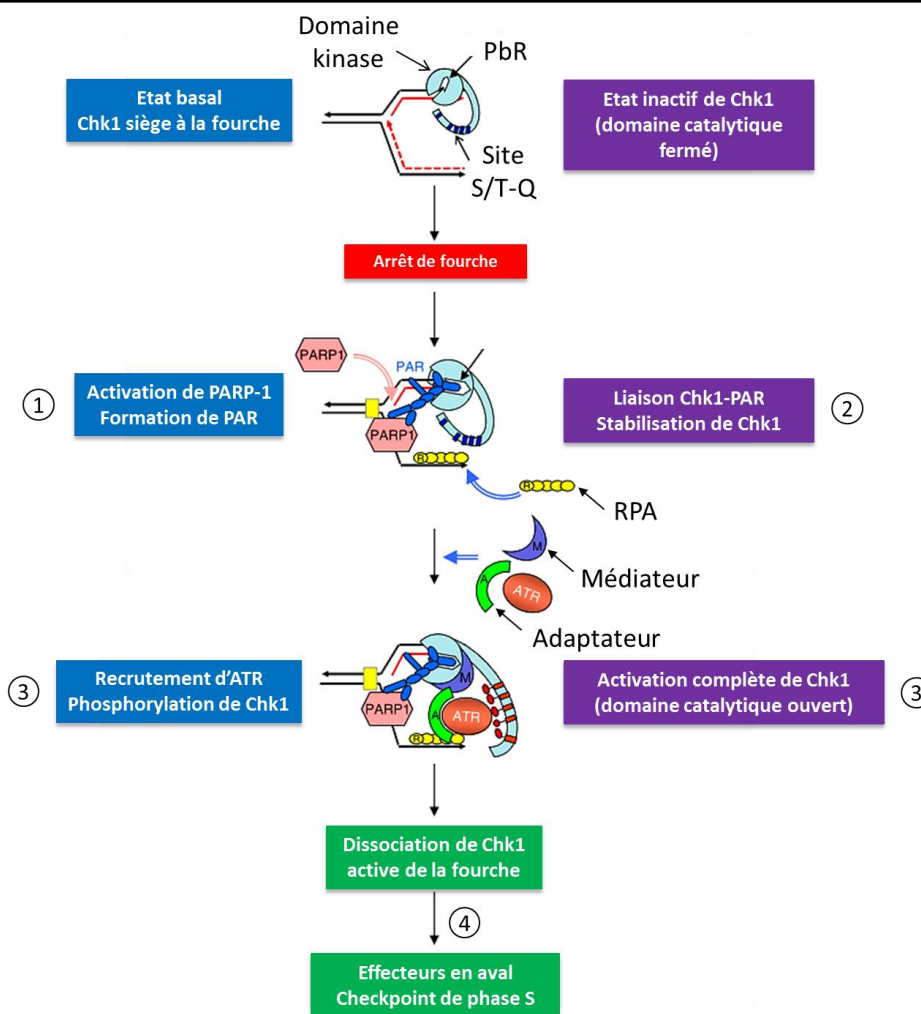
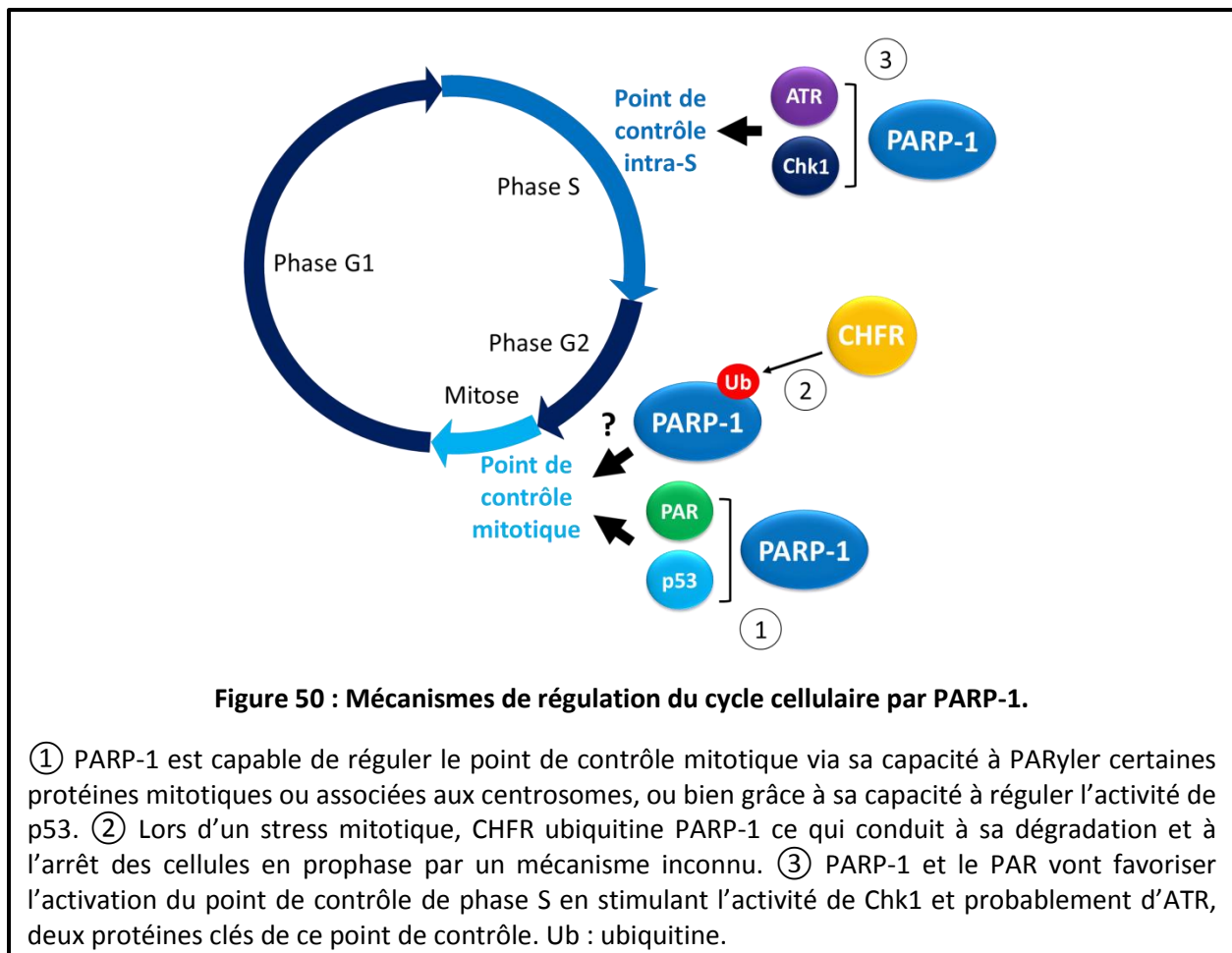


Figure 49 : Modèle d'activation de Chk1 à la fourche dépendant de PAR.

① L'arrêt des fourches de réplication entraîne le recrutement de PARP-1 et de Chk1. ② L'activation de PARP-1 et la synthèse de polymère subséquente va permettre de maintenir Chk1 au niveau de la fourche en créant une interaction entre Chk1 et PAR. RPA ainsi que des adaptateurs et des médiateurs sont recrutés sur l'ADN et favorise la liaison de la kinase ATR, protéine essentielle du point de contrôle de phase S et responsable de l'activation de Chk1. ③ Le maintien de Chk1 via sa liaison au PAR va permettre l'activation complète de Chk1 par ATR. ④ La protéine Chk1 active va ensuite se dissocier de la fourche induisant ainsi la signalétique d'activation du point de contrôle de phase S (d'après Min *et al.*, 2013).

De façon intéressante, une interaction a également été démontrée entre PARP-1 et ATR, cette interaction étant stimulée par l'ajout de PAR (Kedar *et al.*, 2008). De plus, la protéine recombinante ATR est un substrat de PARP-1 (Kedar *et al.*, 2008). Ces données suggèrent qu'en plus de stabiliser Chk1 au niveau de la fourche, PARP-1 pourrait également stimuler l'activation d'ATR, ces deux mécanismes permettant probablement de favoriser l'activation du point de contrôle de phase S (③ de la figure 50).



Ces données démontrent un rôle de PARP-1 dans la régulation de certains points de contrôle clés de la cellule permettant de maintenir la stabilité génétique en prévenant l'apparition d'évènements favorisant la cancérogénèse (Figure 46).

4.5 PARP-1 et régulation transcriptionnelle

Les caractéristiques ces cellules tumorales, incluant la prolifération, le potentiel métastatique et la réponse aux traitements sont largement influencées par la dérégulation de la transcription de

certaines gènes. Ainsi, les profils d'expression de gènes sont de plus en plus utilisés pour définir des biomarqueurs tumoraux ou bien comme indicateurs de sensibilité ou de résistance aux traitements ou encore pour prédire le pronostic d'un patient (pour revue : Johnston et Carroll, 2015).

Au total, PARP-1 régule 3,5% du génome avec une induction de la transcription dans 60 à 70% des cas (Ogino *et al.*, 2007). PARP-1 régule ainsi des gènes impliqués dans la promotion de la cancérogenèse tels que *JUND*, *MDM2*, *HGF*, *FLT1* (VEGFR1), *EGFR*, *HIF2A* (EPAS1), *SPP1* (OPN), *MMP28*, *ANGPT2* et *PDGF* (Quiles-Perez *et al.*, 2010). La régulation de ces gènes se fait via ❶ l'interaction de PARP-1 avec les nucléosomes modulant ainsi la compaction de la chromatine, ou ❷ de manière spécifique à chaque gène par l'intermédiaire de l'interaction de PARP-1 avec des promoteurs ou encore grâce à ❸ un mécanisme résultant d'une combinaison des deux (Kotova *et al.*, 2011 ; Kim *et al.*, 2004).

❶ PARP-1 peut contrôler l'expression de gènes grâce à sa capacité à réguler la compaction de la chromatine et donc à moduler l'accessibilité de l'ADN pour la machinerie de transcription. Ainsi, la liaison simultanée de plusieurs protéines PARP-1 sur de multiples nucléosomes voisins conduit à la formation d'une structure supra-nucléosomale réprimant la transcription (Kim *et al.*, 2004). De plus, ce changement structural est stimulé par la dé-acétylation des histones médiée par un complexe composé de PARP-1, SmarCA4 (« *ATP-dependent helicase Brg1* ») et de certaines HDACs (Hang *et al.*, 2010). De manière intéressante, PARP-1 peut également promouvoir le recrutement de la machinerie de transcription. Ainsi, la PARylation des histones promeut leur dissociation du nucléosomes ce qui conduit à la relaxation de la chromatine et rend accessible l'ADN à la machinerie de transcription (Poirier *et al.*, 1982 ; Krishnakumar et Kraus, 2010 ; Kraus et Lis, 2003). En outre, la PARylation de l'histone H1 entraîne sa dissociation levant ainsi son effet inhibiteur sur la polymérase à ARN II (Krishnakumar et Kraus, 2010).

Tout comme la compaction de la chromatine, la méthylation peut moduler l'accessibilité de l'ADN. L'altération de la méthylation de l'ADN est couramment décrite dans de nombreux cancers et participe à la cancérogenèse (pour revue : Subramaniam *et al.*, 2014). L'inhibition de PARP-1 est associée à la formation d'îlots CpG hyper-méthylés dans le génome et à l'accumulation d'ADN méthylé, les deux phénomènes conduisant à la répression de la transcription (Reale *et al.*, 2005). Cette observation pourrait s'expliquer par la dimérisation, dépendante du PAR, de PARP-1 avec CTCF (« *CCCTC-binding factor* »), un protecteur de la chromatine qui se lie aux régions d'ADN hypo-méthylées. L'inhibition de l'activité de PARP-1 déstabilise le dimère ce qui provoque l'inhibition de CTCF et la méthylation des sites de CTCF qui ne sont désormais plus protégés. Cette méthylation est probablement dépendante de DNMT1 (« *DNA methylation by dimerization with DNA (cytosine-5)-*

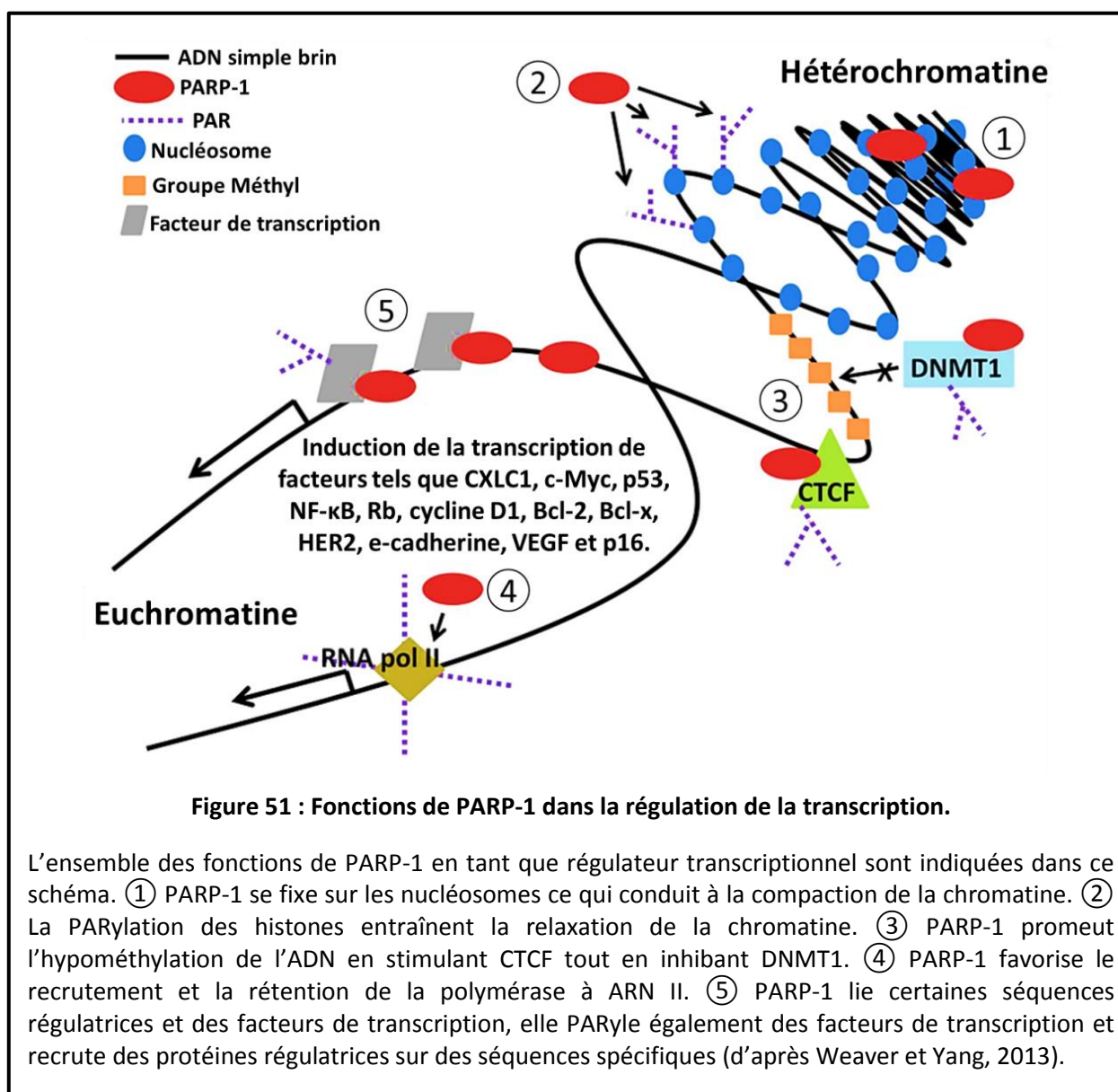
methyltransferase 1 »), une méthyl-transférase surexprimée dans les carcinomes gastro-intestinaux (Reale *et al.*, 2005 ; Kanai *et al.*, 2001). En effet, en absence du complexe PARP-1 / CTCF, DNMT1 va pouvoir se lier au niveau des sites de CTCF ce qui induit leur méthylation (Zampieri *et al.*, 2012). La répression de la transcription qui en découle affecte certains *loci* dont des gènes suppresseurs de tumeurs tels que *CDKN2A-INK4* (p16), *CDH1* (*e-cadherin*), et *P19ARF* (Witcher et Emerson, 2009 ; Farrar *et al.*, 2010). Il est intéressant de noter que la liaison de PARP-1 sur le promoteur de DNMT1 stimule sa transcription en prévenant la méthylation de l'ADN (Zampieri *et al.*, 2009), suggérant ainsi une boucle de rétrocontrôle.

② L'expression des gènes peut être également régulée par une interaction directe entre PARP-1 et l'ADN ou entre PARP-1 et des facteurs de liaisons à l'ADN. PARP-1 agit ainsi au niveau de promoteurs spécifiques ce qui permet de faciliter le relargage de co-régulateurs inhibiteurs tout en favorisant le recrutement de co-régulateurs stimulateurs (Ju *et al.*, 2004 ; Pavri *et al.*, 2005). Par exemple, PARP-1 se lie à la région activatrice de NF- κ B ce qui induit la transcription de *CXCL1* surexprimée dans les mélanomes stimulant ainsi leur prolifération (Nirodi *et al.*, 2001). La liaison de PARP-1 avec le facteur de transcription E2F-1 augmente l'activité du promoteur de ce dernier ce qui entraîne l'expression de ses gènes cibles tels que *MYC* (C-MYC) (Simbulan-Rosenthal *et al.*, 2003). L'expression et l'activité de PARP-1 sont également nécessaires pour : l'invasion des cellules tumorales médiée par les facteurs de transcription ETS et la protéine de fusion EWS-FLI (Brenner *et al.*, 2011 ; Brenner *et al.*, 2012), la suppression de l'auto-inhibition de AP-2, un facteur de transcription qui régule négativement le cycle cellulaire et la prolifération (Kannan *et al.*, 1999) et enfin pour stimuler la transcription de COX-2 promouvant ainsi l'angiogenèse médiée par VEGF (Lin *et al.*, 2011 ; Pylayeva-Gupta *et al.*, 2011).

③ Enfin, la fonction de PARP-1 dans la régulation de la transcription passe également par la régulation de l'activité de la polymérase à ARN II. PARP-1 stimule ainsi l'activité de cette polymérase de manière séquence-spécifique au niveau de promoteurs actifs selon trois mécanismes : (a) la PARylation de l'histone dé-méthylase KDM5B induit son exclusion de la chromatine et le maintien de la modification H3K4me3, ce qui favorise la transcription (Krishnakumar et Kraus, 2010) ; (b) La PARylation du répresseur DEK induit sa dissociation de l'ADN ce qui promeut le recrutement de la polymérase à ARN II (Gamble et Fisher, 2007) ; et (c) finalement la PARylation de cette dernière favorise sa rétention au niveau de l'ADN (Zobeck *et al.*, 2007).

L'ensemble de ces données démontre les rôles cruciaux de PARP-1 dans la régulation transcriptionnelle selon cinq mécanismes distincts illustrés figure 51. De par sa capacité à modifier la compaction de la chromatine, PARP-1 peut moduler le recrutement de la machinerie de transcription

(① et ② de la figure 51). De plus, PARP-1 peut réguler certaines protéines impliquées dans la méthylation de l'ADN conduisant à un état hypo-méthylé favorisant la transcription (③ de la figure 51). PARP-1 stimule également le recrutement et la rétention de la polymérase à ARN II (④ de la figure 51). Enfin, PARP-1 se lie sur certaines séquences spécifiques favorisant ainsi le recrutement et/ou la PARylation de facteurs de transcription ou de protéines régulatrices (⑤ de la figure 51).



4.6 PARP-1 et hormones sexuelles

Les hormones sexuelles sont impliquées dans le développement, la progression et la sensibilité aux traitements des cancers gynécologiques, de la prostate, du sein, ou du colon. Leurs effets sont

médiés par leurs récepteurs qui agissent comme des facteurs de transcription. Chacun des multiples niveaux de régulation contrôlant ces voies de signalisation peuvent être affectés, ce qui conduit à une prolifération anormale, caractéristique des cellules cancéreuses (pour revues : Mathew, 2014 ; Misawa et Inoue, 2015 ; Burkman, 2002). PARP-1 est capable de réguler trois des six hormones sexuelles communément impliquées dans le cancer : le récepteur aux œstrogènes (ER), le récepteur à la progestérone (PR) et le récepteur à l'androgène (AR).

PARP-1 agit sur l'isoforme $Er\alpha$ en interagissant directement avec lui, ce qui promeut sa PARylation et stimule le recrutement d' $Er\alpha$ et d'autres facteurs activateurs sur des gènes cibles. L'estradiol, le ligand d' $Er\alpha$, accentue ce mécanisme en stimulant la PARylation de $Er\alpha$ (Zhang *et al.*, 2013 ; Ju *et al.*, 2006). Ces résultats supposent que, d'un point de vue thérapeutique, l'inhibition de PARP-1 pourrait améliorer l'effet des agents ciblant ER. Une interaction similaire a lieu entre PARP-1 et PR. En effet, CDK2 stimule la PARylation de PR par PARP-1, ce qui induit la prolifération des cellules cancéreuses (Wright *et al.*, 2012). Enfin, PARP-1 est capable de favoriser le recrutement d'AR au niveau de la chromatine et de stimuler son activité de facteur de transcription (Schiewer *et al.*, 2012).

PARP-1 est donc capable de stimuler l'activation de certaines hormones sexuelles conduisant ainsi à une prolifération accentuée, caractéristique des cellules tumorales (Figure 46).

PARP-1 possède donc, en fonction du contexte, à la fois des activités pro-tumorales telles que sa capacité à stimuler la prolifération ou les phénomènes inflammatoires, et des capacités anti-tumorales telles que l'activation de points de contrôle ou l'induction de la mort cellulaire (Figure 46). La prise en compte de ces activités opposées constitue un pivot central dans la détermination de l'intérêt thérapeutique de cibler PARP-1 dans un contexte donné (Weaver et Yang, 2013).

4.7 Cibler PARP-1 dans le traitement des cancers

L'inhibition de PARP-1 semble constituer une approche thérapeutique prometteuse pour le traitement de différentes pathologies humaines (Anders *et al.*, 2010 ; Papeo *et al.*, 2009). Ainsi, un nombre assez conséquent d'essais cliniques ont été initiés ou sont terminés aux USA. Les implications de PARP-1 dans la réponse aux dommages de l'ADN, dans la maintenance des télomères et dans la réponse aux stress sont autant d'arguments permettant d'avoir bon espoir concernant l'utilisation d'inhibiteur de PARP-1 dans les thérapies ciblées de nouvelles générations pour traiter certains cancers. Des maladies présentant une signature inflammatoire telles que les maladies

cardiovasculaires, les désordres métaboliques, le diabète et l'auto-immunité pourraient également constituer de bons candidats (Underhill *et al.*, 2010 ; Telli, 2011 ; Pacher et Szabó 2007 ; Shevalye *et al.*, 2010 ; Masutani *et al.*, 2005 ; Mota *et al.*, 2005). Néanmoins, la plupart des essais cliniques impliquant des inhibiteurs de PARPs sont centrés sur les thérapies anti-cancéreuses (pour revue : Scott *et al.*, 2015).

Ces thérapies reposent principalement sur l'induction d'une létalité synthétique dans les tumeurs déficientes pour la RH (par exemple les tumeurs du sein déficientes pour BRCA1 ou BRCA2, « *breast cancer type 1 susceptibility 1 or 2* »). Cette létalité s'explique probablement par le modèle suivant : l'inhibition de PARP-1 va conduire au blocage du SSBR, les CSBs vont alors s'accumuler et être converties en CDBs lors du passage de la fourche, nécessitant alors leur réparation par RH. En absence des deux voies de réparation, les cellules seront incapables de réparer les dommages et vont donc mourir (Bryant *et al.*, 2005 ; Farmer *et al.*, 2005 ; Fong *et al.*, 2009). Néanmoins, il est important de noter que les bienfaits thérapeutiques des inhibiteurs de PARPs ne se limitent pas à cette létalité synthétique. Ainsi, comme évoqué précédemment, l'inhibition de PARP-1 va favoriser l'efficacité de certains traitements de chimio- ou de radiothérapies en régulant l'expression de gènes tumoraux, en supprimant l'angiogénèse ou en altérant les programmes d'expression de gènes (Rouleau *et al.*, 2010 ; Underhill *et al.*, 2011 ; Telli, 2011).

Toutes les classes actuelles d'inhibiteurs de PARPs sont basées sur l'inhibiteur naturel des PARPs : le nicotinamide (Tableau 10), une molécule intermédiaire dans la voie de synthèse du NAD⁺ (*cf. section 2.3.2, figure 42*). Ces inhibiteurs exploitent une stratégie d'interaction compétitive, similaire à celle observée avec le nicotinamide, empêchant ainsi la fixation du NAD⁺ au niveau du domaine catalytique de PARP-1 ce qui inhibe la synthèse subséquente de PAR (Wahlberg *et al.*, 2012).

Les inhibiteurs de première génération de PARPs tels que le 3-aminobenzamide (3-AB, tableau 10) présentent une faible spécificité pour les protéines PARPs individuelles, inhibant l'ensemble de la famille avec une IC50 de l'ordre du micromolaire. Le 3-AB présente également des effets « *off target* » et une toxicité (Southan et Szabó, 2003). L'addition de nouveaux groupements chimiques a permis d'augmenter la spécificité des inhibiteurs de PARPs et leur affinité. Ces nouveaux inhibiteurs présentent désormais une IC50 de l'ordre du nanomolaire et peuvent même n'inhiber que certains membres de la famille des PARPs. Le Véliparib (ABT-888) et l'Olaparib (AZD-2281) (Tableau 10) disposent ainsi d'une certaine spécificité pour les protéines PARP-1 et 2 alors que le XAV939 affecte majoritairement les tankyrases (Huang *et al.*, 2009 ; Wahlberg *et al.*, 2012 ; Narwal *et al.*, 2012).

Enfin, l'autorisation récente de mise sur le marché de l'Olaparib pour traiter certains cancers spécifiques illustre les possibilités thérapeutiques futures de l'inhibition des PARPs.


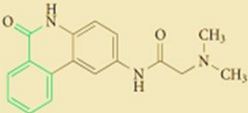
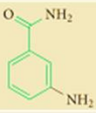
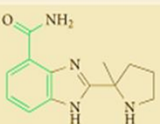
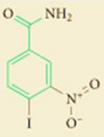
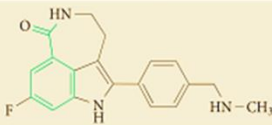
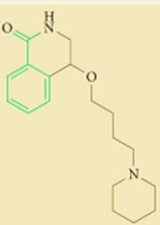
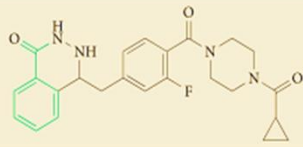
Natural inhibitor (NAD⁺ metabolite)		Phenanthridinone	
Nicotinamide		PJ34	
Benzamide		Benzamidazole	
INO-1001 (3-AB)		Veliparib (ABT-888)	
Iniparib (BSI-201)		Rucaparib (AG-014699)	
DPO		Phthalazinone	
		Olaparib (AZD-2281)	

Tableau 10 : Noms et structure chimique de certains inhibiteurs de PARP-1 (d'après Gibson et Kraus, 2012).

La suite de ce manuscrit est dédiée à la présentation de mon projet de recherche puis aux résultats obtenus au cours de ma thèse.

PRESENTATION DU PROJET DE RECHERCHE

CONTEXTE : LES PONTS ANAPHASIQUES

Comme évoqué plus tôt dans ce manuscrit, les cellules BS présentent une augmentation de la fréquence de certaines anomalies mitotiques telles que les ponts anaphasiques. Ces derniers correspondent à des structures d'ADN reliant les deux pôles d'une cellule au moment de l'anaphase. Ils peuvent être classés selon deux types : les ponts chromatinien et les ponts anaphasiques ultrafins (UFBs). A mon arrivée au laboratoire, la genèse de la formation des ponts anaphasiques dans les cellules BS n'était pas clairement définie. Mon projet de thèse a donc consisté à mieux caractériser les origines moléculaires de ces structures.

5. Les ponts chromatinien

1.1 Généralités

Les ponts chromatinien, ou ponts anaphasiques conventionnels, correspondent à des structures pathologiques résultant de défauts de ségrégation des chromosomes au moment de l'anaphase (McClintock, 1941 ; Gisselsson, 2008). Leur formation constitue à la fois un indicateur et une source d'instabilité chromosomique (Hoffelder *et al.*, 2004). Celle-ci est définie comme des changements fréquents de la structure et du nombre des chromosomes et constitue un composant clé de la tumorigenèse (Jallepalli et Lengauer, 2001). Pour cette raison, l'analyse de la fréquence des ponts chromatinien a été proposée comme pouvant servir d'outil de diagnostic en cancérogenèse (Montgomery *et al.*, 2003).

Les ponts chromatinien sont classiquement visualisés par immunofluorescence grâce à l'utilisation d'intercalants de l'ADN (Chan *et al.*, 2007) (*cf. Figure 7, p.40*), mais il est également possible de les identifier en utilisant des anticorps spécifiques des histones ou bien en marquant ces dernières avec des protéines fluorescentes (Chan *et al.*, 2007 ; Hoffelder *et al.*, 2004 ; Lahkim Bennani-Belhaj *et al.*, 2010). De plus, un certain nombre de protéines sont recrutées au niveau de ces structures. Par exemple, la protéine RAD50, impliquée dans la réparation des CDBs, a été retrouvée sur la majorité des ponts chromatinien et semble participer à leur formation, en particulier après irradiation (Schröder-Heurich *et al.*, 2014). D'autres protéines retrouvées sur certains ponts chromatinien ont également été décrites, notamment l'hélicase PICH et des membres du « *BLM core complex* », tels que BLM, la Topo III α et RMI1 (Baumann *et al.*, 2007 ; Chan *et al.*, 2007 ; Ke *et al.*, 2011). Parmi ces protéines, PICH semble jouer un rôle primordial, puisque sa présence sur les

ponts chromatinien est nécessaire pour le recrutement subséquent des composants du « *BLM core complex* » (Baumann *et al.*, 2007 ; Chan *et al.*, 2007 ; Ke *et al.*, 2011).

1.2 Formation des ponts chromatinien

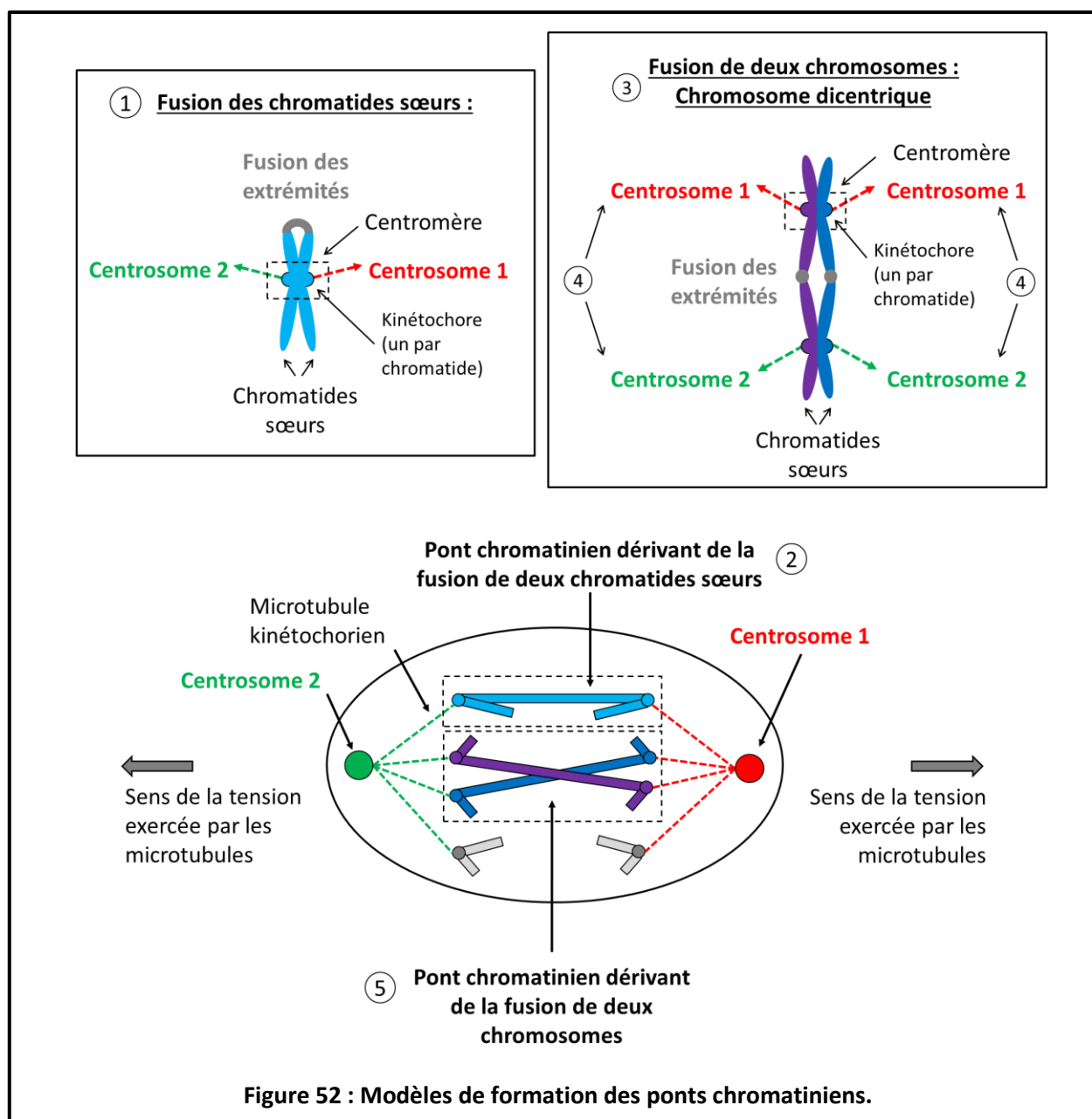
La formation des ponts chromatinien résulte principalement de la présence de CDBs au niveau des extrémités des chromosomes. La prise en charge de ces cassures par les systèmes de réparation, notamment par le NHEJ, va promouvoir la fusion des extrémités des chromosomes (pour revues : Murnane, 2012 ; Gisselson, 2008). En fonction du type de fusion, il est possible de distinguer deux structures chromosomiques différentes qui seront à l'origine de la formation des ponts chromatinien en anaphase.

❶ La fusion des extrémités des chromosomes peut se faire au niveau des télomères de deux chromatides sœurs d'un même chromosome (❶ de la figure 52). Cette fusion a pour conséquence d'empêcher la séparation des chromatides sœurs au moment de l'anaphase entraînant la formation d'un pont chromatinien qualifié de type « chromatide » (❷ de la figure 52) (Gisselson, 2008).

❷ La fusion des extrémités des chromosomes peut également se faire au niveau des télomères de deux chromosomes différents ce qui conduit à la formation d'un chromosome dicentrique, c'est-à-dire possédant deux centromères (❸ de la figure 52) (McClintock, 1941 ; Hoffelder *et al.*, 2004 ; Gisselson, 2008). Le centromère, ainsi que les protéines du kinétochore associées avec celui-ci, forment le « point d'ancrage » des microtubules mitotiques. Ainsi, au cours de l'attachement de ces microtubules, il est possible que les deux kinétochores d'une même chromatide (en violet ou en bleu, figure 53) d'un chromosome dicentrique, soient reliés à des microtubules kinétochoriens associés à des centrosomes opposés (❹ de la figure 52). Par conséquent, lors de la séparation des chromatides sœurs en anaphase, la tension exercée par les microtubules va conduire à la ségrégation incorrecte de ce chromosome dicentrique, se traduisant par la formation subséquente d'un pont chromatinien qualifié de type « chromosome » (❺ de la figure 52) (Gisselson, 2008).

De manière attendue, les ponts chromatinien sont donc virtuellement induits par tout mécanisme conduisant à la formation de CDBs (Gisselson, 2008 ; Murnane, 2012 ; Acilan *et al.*, 2007). Par exemple, l'inhibition de la Topo II α , associée à la formation de CDBs, conduit à la formation de chromosomes dicentriques et de ponts chromatinien (Terasawa *et al.*, 2014). L'inhibition de la RH induit également l'accumulation de CDBs associée à une augmentation de la fréquence des ponts chromatinien (Lahkim Bennani-Belhaj *et al.*, 2010 ; Wilhelm *et al.*, 2014).

Enfin, il est important de noter que le raccourcissement anormal des télomères ou la persistance de la cohésion des chromatides, induisent aussi une augmentation du nombre de ponts chromatinien (de Lange, 2002 ; Hande *et al.*, 1999 ; Coelho *et al.*, 2003 ; Haering et Nasmyth, 2003 ; Murnane, 2012), ce qui suggère que ces mécanismes pourraient également participer à la formation de ce type d'anomalie mitotique.



1.3 Résolution des ponts chromatinien

Les ponts chromatinien représentent des structures complexes dont la « résolution » en mitose va principalement se faire via la formation d'une ou plusieurs cassures. Une étude basée sur des

cellules tumorales exprimant l'histone H2B couplée à la GFP a permis de suivre en vidéomicroscopie le destin des ponts chromatinien au cours de la progression mitotique (Hoffelder *et al.*, 2004). Il a ainsi été montré que dans 90% des cas, le pont chromatinien casse rapidement durant l'anaphase du fait de la force du fuseau mitotique, formant alors au moins deux fragments majeurs. Dans le cas contraire, lorsque les ponts chromatinien perdurent en télophase (10% des cas), ceux-ci sont stabilisés au moment de la cytokinèse ce qui retarde l'abscission selon un mécanisme dépendant de la kinase Aurora B, prévenant ainsi la tétraploïdie (Chen et Doxsey, 2009 ; Steigemann *et al.*, 2009).

La cassure des ponts chromatinien au cours de la mitose constitue donc le mécanisme de « résolution » le plus courant, elle représente cependant une source majeure d'instabilité génétique. En effet, la rupture de ces structures se traduit dans 70% des cas par la formation de micronoyaux. Ceux-ci sont définis comme de petits fragments de chromatine qui demeurent physiquement distincts du noyau et qui sont transcriptionnellement inactifs ; leur formation résulte donc en une perte d'information génétique (Hoffelder *et al.*, 2004 ; pour revue : Fenech *et al.*, 2011). La formation de ces micronoyaux explique ainsi en partie l'instabilité génétique associée aux ponts chromatinien (Hoffelder *et al.*, 2004). Une autre conséquence de la rupture d'un pont chromatinien au cours de l'anaphase est la formation d'une ou plusieurs CDBs retrouvées à l'interphase qui suit, favorisant ensuite la formation de nouveaux ponts chromatinien lors de la mitose suivante. Ce cycle délétère a ainsi été nommé « *breakage-fusion-bridge* », et constitue une autre source d'instabilité génétique associée aux ponts chromatinien (McClintock, 1941 ; Hoffelder *et al.*, 2004).

Les données concernant une éventuelle résolution de ces structures, évitant leur rupture par la force du fuseau mitotique, sont peu nombreuses. Ainsi, il a été montré que les hélicases PICH et BLM sont recrutées sur certains ponts chromatinien et que leur déplétion conduit à une augmentation de la fréquence de ces derniers (Chan *et al.*, 2007 ; Hübner *et al.*, 2010 ; Kaulich *et al.*, 2012 ; Petsalaki *et al.*, 2014). Il a donc été suggéré que ces protéines pourraient jouer un rôle dans la résolution de ces structures. Le mécanisme impliqué n'est cependant pas connu à l'heure actuelle.

Un modèle proposant que la résolution des ponts chromatinien se ferait selon un mécanisme induisant la formation d'UFBs plus flexibles a été publié en 2011 (Ke *et al.*, 2011). Les auteurs ont proposé que l'activité de remodelage de la chromatine de PICH, associée à la présence de BLM, catalyserait le retrait des histones des ponts chromatinien augmentant ainsi leur flexibilité ce qui favoriserait finalement leur résolution. Les ponts chromatinien ainsi débarrassés des histones deviendraient alors des UFBs (Ke *et al.*, 2011). Bien qu'élégant, ce modèle présente cependant des faiblesses majeures. En effet, si les UFBs sont la conséquence du retrait des histones des ponts chromatinien par l'activité conjointe de BLM et de PICH, alors la déplétion de BLM devrait

augmenter la fréquence des ponts chromatiniens tout en diminuant la fréquence des UFBs. Or, en absence de BLM la fréquence de ces deux structures est augmentée (Chan *et al.*, 2007 ; Baumann *et al.*, 2007). En outre, les ponts chromatiniens sont observés dans une faible proportion de cellules, alors que des UFBs sont présents dans la grande majorité des anaphases, même en condition basale (Baumann *et al.*, 2007). Enfin, des données plus récentes ont remis en question l'activité de remodelage de la chromatine de PICH (Biebricher *et al.*, 2013) et ont montré que la mutation de l'activité ATPase de cette dernière résulte en une augmentation de la fréquence des ponts chromatiniens sans affecter celle des UFBs (Kaulich *et al.*, 2012). Ces observations suggèrent que la résolution des ponts chromatiniens n'est pas associée à la formation des UFBs et qu'elle est dépendante de l'activité ATPase de PICH.

L'idée d'une augmentation de la flexibilité des ponts chromatiniens, empêchant ainsi leur rupture par la force du fuseau mitotique, semble néanmoins possible. Le recrutement de PICH sur les UFBs et sur les ponts chromatiniens suggère que cette dernière interagit avec l'ADN indépendamment de la présence d'histones, ce qui suppose que son recrutement est dépendant d'une conformation d'ADN spécifique. Ainsi, la création d'une structure *in vitro* mimant un pont anaphasique a permis de montrer que PICH se lie à l'ADN de manière proportionnelle à la tension exercée sur ce dernier (Biebricher *et al.*, 2013). En outre, grâce à son activité translocase dépendante de l'ATP, PICH facilite également l'extension de ce pont anaphasique synthétique en stabilisant la double hélice d'ADN lorsque celle-ci est soumise à une force d'étirement (Biebricher *et al.*, 2013). Le recrutement de PICH sur les ponts chromatiniens pourrait donc favoriser l'extension et la stabilité de cette structure limitant sa rupture par la force du fuseau mitotique. La résolution du pont chromatинien par un mécanisme encore inconnu pourrait alors avoir lieu.

Bien que les hélicases BLM et PICH semblent importantes pour limiter la fréquence des ponts chromatiniens, leurs fonctions sur ces ponts ne sont pas clairement définies pour l'instant.

6. Les ponts anaphasiques ultrafins (UFBs)

2.1 Généralités

Les ponts anaphasiques ultrafins (UFBs) sont des structures physiologiques virtuellement présentes à l'état basal dans toutes les lignées cellulaires et correspondent à des défauts de ségrégation des chromatides (Chan *et al.*, 2007 ; Baumann *et al.*, 2007 ; Chan *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2010 ; Vinciguerra *et al.*, 2010). Ils sont détectables dès la métaphase et peuvent perdurer jusqu'en télophase. La longueur des UFBs augmente au cours de la progression mitotique, variant entre 1,5 et 12 μM dans des cellules HeLa, tandis que leur nombre diminue graduellement (Baumann

et al., 2007 ; Chan *et al.*, 2007). Enfin, ils sont considérés comme des marqueurs d'instabilité génétique, l'augmentation de leur fréquence ayant été associée à une augmentation des foyers γ -H2AX en mitose et des foyers 53BP1 en G1 (Lukas *et al.*, 2011 ; Broderick *et al.*, 2015 ; Hengeveld *et al.*, 2015).

Contrairement aux ponts chromatinien, les UFBs ne contiennent pas d'histones et ne peuvent être visualisés à l'aide de marquages par des colorants classiques de l'ADN. Leur découverte tardive n'a été possible que grâce à un marquage par immunofluorescence utilisant des anticorps spécifiques de deux hélicases : PICH et BLM, toutes deux recrutées sur ces structures (Baumann *et al.*, 2007 ; Chan *et al.*, 2007) (*cf. Figure 8, p.41*). D'autres protéines ont été détectées sur les UFBs, notamment les membres du « *BLM core complex* » qui sont recrutés sur certains UFBs (Baumann *et al.*, 2007 ; Barefield et Karlseder, 2012 ; Chan *et al.*, 2009 ; Ke *et al.*, 2011). En revanche, des protéines impliquées dans les voies de réponse aux dommages de l'ADN, incluant WRN, PML, RAD51, NSB1, MLH1 et γ -H2AX ne sont pas associées à ces structures (Chan *et al.*, 2007). Il est intéressant de souligner l'absence de γ -H2AX qui suggère que, contrairement aux ponts chromatinien, les UFBs ne sont pas le reflet de CDBs non résolues (Chan *et al.*, 2007). Parmi les protéines recrutées sur les UFBs, PICH jouerait un rôle central. En effet, de manière similaire à ce qui a été observé pour les ponts chromatinien, PICH est nécessaire au recrutement de BLM et des autres composants du « *BLM core complex* » sur les UFBs (Baumann *et al.*, 2007 ; Chan *et al.*, 2007 ; Ke *et al.*, 2011). En outre, PICH marque les UFBs dès la métaphase (Baumann *et al.*, 2007) tandis que BLM n'est détectable sur ceux-ci qu'en anaphase (Chan *et al.*, 2007, Chan *et al.*, 2009), suggérant ainsi un recrutement de BLM uniquement sur des UFBs préexistants. Etant donné que PICH est nécessaire au recrutement de BLM sur les UFBs et que ceux-ci ne sont pas marqués par les intercalants classiques de l'ADN, le marquage de PICH constitue actuellement la méthode classique de détection de ces structures. Néanmoins, le fait que certains ponts chromatinien n'arborent pas de marquage PICH, implique qu'il est également possible que des UFBs ne présentent pas de marquage PICH. Cette hypothèse, renforcée par la mise en évidence d'UFBs uniquement marqués par la protéine FANCM (Vinciguerra *et al.*, 2010), suggère par conséquent l'existence d'une ou plusieurs populations d'UFBs demeurant invisibles via les techniques actuelles classiques de détection.

2.2 Formation des UFBs

Actuellement, trois types d'UFBs différents ont été décrits et sont classés en fonction de la localisation chromosomique de leurs « points d'ancrages », c'est-à-dire de la position relative de leurs extrémités sur le chromosome. Ces trois types d'UFBs sont : ❶ les UFBs centromériques (C-UFBs), ❷ les UFBs associés aux sites fragiles communs (FS-UFBs), et enfin ❸ les UFBs télomériques

(T-UFBs). La majorité des UFBs ont pour origine les centromères (C-UFBs), ils présentent en effet à leurs extrémités des marqueurs centromériques tels que CREST ou HEC1 (Baumann *et al.*, 2007 ; Chan *et al.*, 2007). Les FS-UFBs sont caractérisés par la présence des protéines de Fanconi FANCD2 et FANCI à leurs extrémités (Chan *et al.*, 2009), alors que les T-UFBs ont été identifiés grâce à des sondes télomériques (Barefield et Karlseder, 2012). La nature exacte de ces trois types d'UFBs n'est actuellement pas connue. Néanmoins ceux-ci ont pour caractéristiques communes qu'ils sont tous associés à des régions génomiques considérées comme difficiles à répliquer. Il a donc été proposé que les UFBs puissent être constitués d'ADN non répliqué ou de structures d'ADN anormales perdurant en mitose (Liu *et al.*, 2014).

2.2.1 La formation des UFBs centromériques (C-UFBs)

L'ADN centromérique correspond à une région chromosomique spécialisée maintenue sous forme d'hétérochromatine et composée de séquences répétées appelées α -satellites (Choo, 2001 ; Schueler et Sullivan, 2006). Le centromère est la seule région du chromosome présentant une cohésion entre les chromatides sœurs au moment de la métaphase. En effet, la cohésion au niveau des centromères n'est perdue que plus tard au cours de la mitose, à l'entrée en anaphase (Hauf *et al.*, 2001 ; Nakajima *et al.*, 2007 ; Uhlmann *et al.*, 2000). Cependant, alors même que la cohésion est perdue, des entrelacements d'ADN au niveau des centromères peuvent prévenir la disjonction correcte des chromatides sœurs au moment de l'anaphase (Wang *et al.*, 2010). Une des manifestations de ces entrelacements d'ADN centromériques pourrait être la formation des C-UFBs en anaphase. Il existe actuellement deux hypothèses concernant l'origine de ces entrelacements d'ADN et leur lien avec les C-UFBs.

❶ Il a été proposé que ces entrelacements puissent résulter de structures de RH non résolues et dérivant des D-loops formées par les séquences répétées des centromères (McFarlane et Humphrey, 2010 ; Liu *et al.*, 2014). Cette hypothèse est néanmoins en contradiction avec des résultats obtenus au laboratoire démontrant que la formation des UFBs est indépendante de la RH médiée par RAD51 (Lahkim Bennani-Belhaj *et al.*, 2010). ❷ La seconde hypothèse est que ces entrelacements seraient la conséquence de la présence de caténations d'ADN non résolues au niveau des centromères. Les caténations correspondent à des séquences d'ADN complètement répliquées mais toujours entremêlées et sont la conséquence des processus de réplication ou de réparation (pour revue : Baxter, 2015). Au niveau des centromères, la décaténation de ces structures prend place après le retrait de la cohésine (Wang *et al.*, 2010). Or, il a été montré que le retrait prématuré de la cohésine au niveau des centromères, avant que la résolution des caténations centromériques ait débutée, induit une augmentation de la fréquence des C-UFBs (Baumann *et al.*, 2007). Il a donc

été proposé que la formation de ce type d'UFBs pourrait être dépendante de la résolution des caténations centromériques. En accord avec cette hypothèse, l'inhibition de la Topo II α , principale enzyme responsable de la résolution de ces caténations (Porter et Farr, 2004), induit également une augmentation significative de la fréquence des C-UFBs (Chan *et al.*, 2007 ; Hengeveld *et al.*, 2015). Ces données supposent donc que la formation de ces structures est dépendante de la résolution des caténations centromériques par l'activité de la Topo II α après le retrait de la cohésine.

L'hypothèse la plus couramment admise concernant l'origine des C-UFBs est qu'ils résulteraient de caténations d'ADN non résolues avant le début de l'anaphase (①, figure 53).

2.2.2 La formation des UFBs associés aux sites fragiles communs (FS-UFBs)

Les sites fragiles communs (CFS : « *common fragile site* ») correspondent à de larges régions chromosomiques particulièrement instables et caractérisées par leur susceptibilité à présenter des CDBs après inhibition de la synthèse d'ADN, notamment avec de l'APH (pour revues : Gelot *et al.*, 2015 ; Le Tallec *et al.*, 2014). Les cassures au niveau des CFS sont en effet peu nombreuses à l'état basal, alors qu'elles sont particulièrement induites par un stress de réplication, révélant ainsi la fragilité des CFS. Cette sensibilité aux stress de réplication a été corrélée à la présence de larges régions pauvres en origines de réplication qui impliquent que la réplication des CFS doit se faire via un nombre restreint de fourches de réplication qui devront alors parcourir de longues distances (Letessier *et al.*, 2011 ; Palumbo *et al.*, 2010). La fragilité des CFS pourrait également être liée à la présence de séquences riches en AT qui favorisent la formation de structures secondaires de l'ADN connues pour perturber la réplication (Zlotorynski *et al.*, 2003 ; Boyer *et al.*, 2013). En raison de leur sensibilité aux événements affectant le programme de réplication, il est largement admis que les CFS demeurent partiellement non répliqués en mitose, expliquant leur susceptibilité à présenter des cassures au moment de la condensation de l'ADN (pour revue : Durkin et Glover, 2007).

Les FS-UFBs sont caractérisés par la présence de certaines protéines de Fanconi à leurs extrémités. En effet, des foyers FANCD2 et FANCI ont été détectés à chaque extrémité d'un faible pourcentage d'UFBs (Chan *et al.*, 2009 ; Naim et Rosselli, 2009). Etant donné que ces protéines sont recrutées au niveau des CFS en interphase et qu'un traitement avec de l'APH conduit à leur recrutement au niveau des cassures de l'ADN en mitose (Naim et Rosselli, 2009), les UFBs marqués par ces dernières ont été associés à des séquences correspondant à des CFS. En accord avec cette hypothèse, les FS-UFBs sont peu nombreux à l'état basal mais sont fortement induits par un traitement avec des doses faibles d'APH (Chan *et al.*, 2009). Ces résultats suggèrent donc que les FS-UFBs ont probablement pour origine des séquences d'ADN non répliquées, résultant de la fragilité

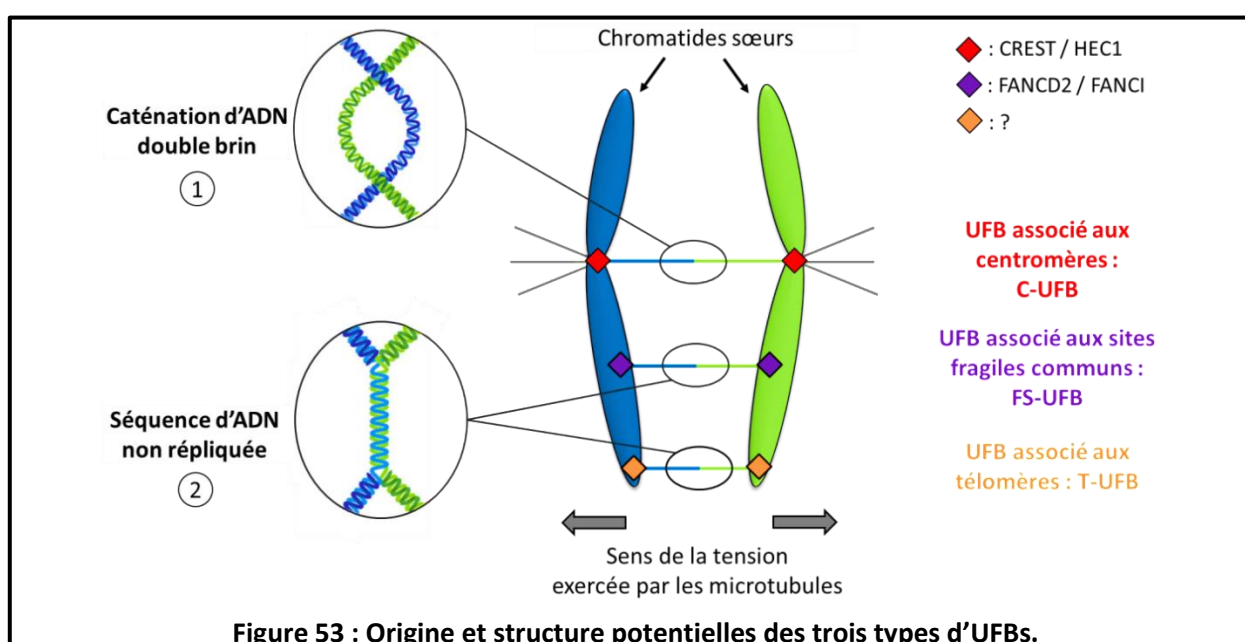
des CFS, et qui vont perturber la séparation correcte des chromatides sœurs (Liu *et al.*, 2014). Il est intéressant de noter qu'un stress de réplication chez la levure entraîne la formation de structures analogues aux UFBs (Sofueva *et al.*, 2011), ce qui indique que ce mécanisme semble être conservé au cours de l'évolution.

L'hypothèse la plus couramment admise concernant l'origine des FS-UFBs est qu'ils résulteraient de séquences d'ADN non répliquées situées au niveau des CFS et perdurant en mitose (②, figure 53).

2.2.3 La formation des UFBs télomériques (T-UFBs)

Des UFBs ayant pour origine les télomères ou les régions proches des télomères ont également été observés. Ces derniers sont induits par un traitement avec de l'APH (Barefield et Karlseder, 2012 ; Chan *et al.*, 2009) ou après déplétion de la protéine WRN (Barefield et Karlseder, 2012). Les caractéristiques des T-UFBs restent à déterminer mais ces structures semblent partager des similarités avec les FS-UFBs (notamment leur induction après APH), vraisemblablement car ces deux types d'UFBs résultent de séquences difficiles à répliquer. En effet, chez les mammifères, les télomères sont composés de plusieurs kilobases de répétitions TTAGGG formant des structures en G-quadruplexes (Ishikawa, 2013 ; Drosopoulos *et al.*, 2015). Celles-ci vont gêner la réplication de l'ADN, favorisant l'accumulation de séquences d'ADN non répliquées perdurant en mitose. Ces dernières seraient alors à l'origine de la formation des T-UFBs, selon un mécanisme similaire aux FS-UFBs (Liu *et al.*, 2014).

L'hypothèse la plus couramment admise concernant l'origine des T-UFBs est qu'ils seraient la conséquence de séquences d'ADN télomériques non répliquées perdurant en mitose (②, figure 53).



2.3 Résolution des UFBs

L'augmentation du nombre de foyers 53BP1 lorsque le nombre d'UFBs augmente suppose qu'une partie des UFBs casse en mitose conduisant à la présence de dommages à la G1 suivante (Lukas *et al.*, 2011 ; Naim *et al.*, 2013 ; Broderick *et al.*, 2015 ; Hengeveld *et al.*, 2015). Néanmoins, contrairement aux ponts chromatinien, la rupture des UFBs n'affecterait qu'une proportion très restreinte de ces derniers, ce qui s'explique sans doute par une flexibilité plus grande leur apportant une certaine résistance aux forces du fuseau mitotique (Lukas *et al.*, 2011 ; Biebricher *et al.*, 2013). De plus, le nombre d'UFBs étant très faible en télophase, voire nul en fonction du modèle cellulaire, cela suggère que la majorité des UFBs sont vraisemblablement résolus en anaphase (Chan *et al.*, 2007 ; Baumann *et al.*, 2007 ; Lukas *et al.*, 2011). Les principaux modèles expliquant cette résolution sont issus des connaissances concernant les protéines recrutées sur les UFBs. Parmi ces protéines, l'hélicase PICH joue probablement un rôle central. PICH est une translocase à ADN dépendante de l'ATP (Baumann *et al.*, 2007 ; Biebricher *et al.*, 2013). Comme évoqué précédemment, PICH est recrutée sur les UFBs dont elle marque généralement toute la longueur (Chan *et al.*, 2007 ; Baumann *et al.*, 2007). Cette observation semble surprenante puisqu'il n'y a probablement qu'une petite région de l'UFB qui contient des caténations ou de l'ADN non répliqué. Cela suppose que PICH serait plutôt recrutée sur une conformation bien particulière d'ADN propre aux UFBs. En accord avec cette hypothèse, la création d'une structure *in vitro* mimant un pont anaphasique a permis de montrer que PICH se lie à l'ADN de manière proportionnelle à la tension exercée sur ce dernier (Biebricher *et al.*, 2013). De plus, PICH facilite également l'extension de ce pont anaphasique synthétique favorisant la stabilité de la double hélice d'ADN lorsque celle-ci est soumise à une tension (Biebricher *et al.*, 2013). Etant donné que la taille des UFBs augmente au cours de la progression mitotique (Baumann *et al.*, 2007), ce qui suppose une augmentation de la tension exercée sur ces derniers, il est probable que PICH soit recrutée *in vivo* sur l'ensemble de l'UFB pour favoriser sa stabilité lors de la séparation des chromatides sœurs évitant ainsi sa rupture.

Sur la base de ces travaux, un modèle de résolution des UFBs s'articulant autour de PICH a été proposé. Lorsque la disjonction des chromatides sœurs est initiée, la tension appliquée sur les régions d'ADN présentant des caténations ou de l'ADN non répliqué, induit le recrutement de PICH. Ensuite, lorsque ces régions sont étirées, formant ainsi un UFB, PICH recouvre l'ensemble de cette structure ce qui favorise sa stabilisation, vraisemblablement en facilitant l'extension de l'UFB. Enfin, PICH permet le recrutement des autres protéines présentes sur les UFBs, incluant le « *BLM core complex* » sans doute à l'origine des étapes suivantes de la résolution des UFBs (Liu *et al.*, 2014). Celles-ci consisteraient en un désappariement des duplexes d'ADN catalysé par BLM, ce qui

génèrerait de l'ADN simple brin et expliquerait le recrutement tardif de RPA sur les UFBs (Chan *et al.*, 2007 ; Hengeveld *et al.*, 2015). Les UFBs dorénavant composés d'ADN simple brin pourraient être finalement résolus par la Topo III α (Liu *et al.*, 2014).

Une série d'études récentes a également identifié TopBP1 comme un acteur probable de la résolution des C-UFBs. TopBP1 est effectivement recrutée sur les UFBs (Germann *et al.*, 2014) et en particulier sur les C-UFBs (Broderick *et al.*, 2015). Sa déplétion conduit à l'augmentation de la fréquence des UFBs (Broderick *et al.*, 2015) associée à une augmentation du nombre de foyers 53BP1 en G1 (Pedersen *et al.*, 2015). De plus, TopBP1 interagit avec le domaine C-terminal de la Topo II α , ce qui est nécessaire au recrutement de cette dernière au niveau de l'extrémité des C-UFBs (Broderick *et al.*, 2015). Il a alors été suggéré que TopBP1 pourrait avoir un rôle dans la prévention de l'accumulation de dommages de l'ADN lors de la transition mitose-G1, probablement en favorisant la résolution, en coopération avec la Topo II α , des caténations d'ADN à l'origine des C-UFBs.

La protéine Rif1 pourrait également participer à la résolution des C-UFBs. Il a ainsi montré que Rif1 est retrouvée sur un nombre important de C-UFBs en début d'anaphase, puis disparaît progressivement au cours de la progression mitotique (Hengeveld *et al.*, 2015). De façon intéressante, le recrutement de Rif1 sur les UFBs est fortement induit par des inhibiteurs de la Topo II α et dépend de la présence de PICH mais pas de celle de BLM (Hengeveld *et al.*, 2015). Cette observation renforce le rôle central de PICH dans la prise en charge des UFBs. Enfin, la déplétion de Rif1 a été associée à un retard dans la résolution des C-UFBs au cours de la progression mitotique, se traduisant par l'accumulation de ces structures en anaphase tardive et par une augmentation du nombre de foyers 53BP1 au cours de la G1 suivante (Hengeveld *et al.*, 2015). Etant donné les similarités phénotypiques observées après la déplétion de TopBP1 ou de Rif1, il est probable que ces deux protéines participent au même mécanisme de résolution des C-UFBs.

Enfin, FANCM est recrutée sur certains UFBs en fin d'anaphase et sa déplétion conduit à une augmentation de la fréquence de ces derniers suggérant qu'elle pourrait participer à leur résolution (Vinciguerra *et al.*, 2010 ; Liu *et al.*, 2014). De manière intéressante, FANCM est généralement recrutée sur des UFBs ne présentant pas de marquage BLM ou PICH. Cette observation confirme l'existence d'une population d'UFBs qui ne serait pas marquée par PICH, et suppose que FANCM est sans doute impliquée dans un mécanisme de résolution qui prend le relais de PICH et du « *BLM core complex* » en fin d'anaphase (Vinciguerra *et al.*, 2010). L'activité translocase de FANCM (Gari *et al.*, 2008) pourrait ainsi permettre la stabilisation de l'UFB et sa résolution selon un mécanisme similaire à celui décrit pour l'activité translocase de PICH (Biebricher *et al.*, 2013).

A l'heure actuelle, les mécanismes de résolution des UFBs ne sont donc pas encore bien définis, bien que l'implication de différentes protéines telles que PICH, BLM, TopBP1, Rif1 ou encore FANCM dans ce processus soit suspectée.

HYPOTHESE DE TRAVAIL

A mon arrivée au laboratoire, les mécanismes à l'origine de la formation et de la résolution des ponts anaphasiques n'étaient donc pas clairement définis. Dans ce contexte, et sur la base de résultats obtenus au laboratoire avant mon arrivée qui ont fait l'objet de deux thèses suivies de deux publications (Chabosseau *et al.*, 2011 ; Rouzeau *et al.*, 2012), l'objectif de mon projet de thèse était d'identifier les mécanismes moléculaires à l'origine de l'augmentation de la fréquences des ponts anaphasiques dans des cellules déficientes en hélicase BLM, afin d'appréhender leurs relations fonctionnelles potentielles avec l'instabilité génétique et la cancérogenèse.

La première étude qui a servi de base à mon projet a révélé une diminution drastique de l'expression de la CDA en absence de BLM et un déséquilibre du pool de pyrimidines subséquent, et a montré que ce dernier était directement à l'origine de plusieurs aspects du phénotype Bloom, dont le ralentissement de la vitesse de progression des fourches de réplication et une partie de l'augmentation de la fréquence des SCEs (Chabosseau *et al.*, 2011). La seconde étude a révélé pour la première fois une localisation de l'hélicase BLM aux centromères. D'un point de vue fonctionnel, cette étude a montré que la déficience en BLM entraîne des anomalies de la structure des centromères et du recrutement de la topoisomérase II α aux centromères. Ces résultats ont conduit à un modèle proposant un rôle de BLM dans la prévention d'UFBs surnuméraires d'origine centromérique (Rouzeau *et al.*, 2012).

Sur la base de ces données, mon hypothèse de travail était donc que la perte d'expression de la CDA, consécutive à la déficience en BLM (Chabosseau *et al.*, 2011), pourrait favoriser la formation des ponts anaphasiques dans les cellules BS, expliquant ainsi l'augmentation de leur fréquence caractéristique du phénotype Bloom.

RESULTATS

1

Gemble et al., Plos Genetics, 2015

**Le déséquilibre du pool de pyrimidines
induit par la déficience en CDA inhibe
l'activité de PARP-1, conduisant à la
réplication incomplète de l'ADN**

Pyrimidine Pool Disequilibrium Induced by a Cytidine Deaminase Deficiency Inhibits PARP-1 Activity, Leading to the Under Replication of DNA.



Gemble S¹, Ahuja A², Buhagiar-Labarchède G¹, Onclercq-Delic R¹, Dairou J³, Biard DS⁴, Lambert S¹, Lopes M², Amor-Guérét M¹.

PLoS Genet. 2015 Jul 16;11(7):e1005384. doi: 10.1371/journal.pgen.1005384. eCollection 2015.

Author information :

1. Institut Curie, Centre de Recherche, Orsay, France; CNRS UMR 3348, Stress Génomiques et Cancer, Centre Universitaire, Orsay, France.
2. Institute of Molecular Cancer Research, University of Zurich, Zurich, Switzerland.
3. Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative (BFA) UMR 8251 CNRS, Plateforme Bioprofiler Bâtiment Buffon, 346A Case 7073, Paris, France.
4. CEA, DSV, iMETI, SEPIA, Fontenay-aux-Roses Cedex, France.

L'ensemble des lignées cellulaires utilisées lors de mon projet de thèse sont décrites en Annexe, section « Descriptions des modèles cellulaires utilisés au laboratoire » p.289.

Les cellules BS présentent une augmentation de la fréquence des UFBs et des ponts chromatinien dont l'origine n'est pas claire. Les travaux réalisés lors de la première partie de ma thèse ont consisté à déterminer si le déséquilibre du pool de pyrimidines dû à la déficience en CDA dans les cellules BS pouvait être impliqué dans l'augmentation de la fréquence des ponts anaphasiques observée en absence d'une protéine BLM fonctionnelle.

La CDA prévient la formation des UFBs indépendamment de l'expression de BLM :

La déplétion de la protéine BLM conduisant à la perte d'expression de la CDA (Chabosseau *et al.*, 2011), nous avons construit un modèle cellulaire pour pouvoir démontrer formellement les rôles

respectifs de BLM et de la CDA dans l'augmentation de la fréquence des ponts anaphasiques. Ainsi, nous avons construit une lignée cellulaire BS exprimant BLM et la CDA sous le contrôle de deux promoteurs différents, permettant ainsi de dépléter ces dernières indépendamment l'une de l'autre. Nous avons alors montré que la déplétion par ARN interférence de la CDA (ou son inhibition chimique) conduit à une augmentation de la fréquence des UFBs sans affecter celle des ponts chromatinien. A l'inverse, la déplétion de BLM induit une augmentation de la fréquence des ponts chromatinien sans modifier celle des UFBs. Ces résultats démontrent ainsi pour la première fois que la déficience en CDA et le déséquilibre du pool de pyrimidines subséquent, sont à l'origine de l'augmentation de la fréquence des UFBs dans les cellules BS. En revanche, c'est l'absence de protéine BLM fonctionnelle *per se* qui explique l'augmentation de la fréquence des ponts chromatinien dans ces mêmes cellules. Il est important de noter que les C-UFBs et les FS-UFBs sont affectés de la même manière par l'absence de la CDA ce qui suppose que la perte d'expression de cette dernière induit la formation d'UFB selon un mécanisme commun à ces deux types d'UFBs. De façon intéressante, le rôle de la CDA dans la prévention de l'augmentation du nombre d'UFBs n'est pas restreint aux cellules BS. En effet, la déplétion de la CDA par expression stable d'un shRNA spécifique de cette dernière dans la lignée de cancer du col de l'utérus HeLa (exprimant une protéine BLM fonctionnelle), entraîne une augmentation de la fréquence des UFBs sans affecter la fréquence des ponts chromatinien. Des résultats similaires ont également été obtenus après déplétion stable de la CDA dans la lignée de cancer du sein HCC-1143 (données non publiées). Ces deux exemples démontrent que l'absence de la CDA promeut la formation d'UFBs, indépendamment de la lignée cellulaire et du statut de BLM. Nous avons donc identifié la déficience en CDA et le déséquilibre du pool de pyrimidines qui en découle comme étant à l'origine d'une augmentation de la fréquence des UFBs centromériques et associés aux CFS.

La formation des UFBs ne résulte pas d'un découplage entre hélicase et polymérase :

Afin de déterminer l'origine moléculaire de la formation des UFBs en absence de la CDA, nous nous sommes intéressés au modèle présenté par Arlt et Glover en 2010. Dans cette étude, les auteurs ont proposé qu'un ralentissement de la vitesse de progression des fourches de réplication pourrait être à l'origine d'un découplage entre hélicase et polymérase se traduisant par une augmentation des « *gaps* » et des cassures au niveau des CFS, et par une augmentation de la quantité d'ADN simple brin au niveau des fourches de réplication. Les auteurs ont alors émis l'hypothèse selon laquelle le ralentissement de la vitesse de progression des fourches de réplication et le découplage subséquent pourraient être une source d'instabilité génétique au niveau des CFS

(Arlt et Glover, 2010). Ils ont également montré qu'il était possible de prévenir les anomalies associées au découplage par un traitement des cellules avec une dose très faible de CPT (de l'ordre du pM) (Arlt et Glover, 2010). La CPT étant un inhibiteur de la topoisomérase I, les auteurs ont donc proposé que sa capacité à prévenir les phénotypes associés au découplage résulte probablement d'un ralentissement du couple hélicase/topoisomérase I qui va alors se synchroniser à nouveau avec la polymérase. Etant donné que la déficience en CDA induit un ralentissement de la vitesse de progression des fourches de réplication (Chabosseau *et al.*, 2011), nous avons cherché à déterminer si un découplage hélicase/polymérase pouvait en résulter et être à l'origine de la formation des UFBs. Pour cela, nous avons traité des lignées exprimant ou non la CDA avec une dose faible de CPT et nous avons analysé la fréquence des UFBs. De manière intéressante, un traitement avec 2 pM de CPT permet de prévenir l'augmentation de la fréquence des UFBs dans les cellules déficientes en CDA. En revanche, une étude par microscopie électronique effectuée par l'équipe de Massimo Lopes (Zurich, Suisse) a révélé que la taille des « *gaps* » d'ADN simple brin au niveau des fourches de réplication, qui constitue un marqueur direct du découplage, ne varie pas de manière significative en fonction de l'expression de la CDA ou en réponse à la CPT. Ces résultats suggèrent que la formation des UFBs en absence de la CDA est donc la conséquence d'un autre phénomène, supprimé par un traitement avec 2 pM de CPT, mais qui n'est pas lié à un découplage global entre hélicase et polymérase.

La déficience en CDA compromet la complétion de la réplication avant la fin de la phase S ce qui conduit à la formation d'UFBs :

Nous avons ensuite cherché un mécanisme moléculaire alternatif par lequel la déficience en CDA pourrait promouvoir la formation des UFBs. Deux hypothèses étaient proposées pour expliquer l'origine de ces structures : elles seraient la conséquence soit de caténations d'ADN non résolues à la fin de la réplication, soit de séquences d'ADN non répliquées perdurant en mitose (Liu *et al.*, 2014). Afin de tester cette deuxième hypothèse nous avons directement marqué l'ADN en ajoutant de l'EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) au milieu de culture des cellules pendant les phases S et G2. L'analyse des ponts anaphasiques en mitose a montré que tous les ponts chromatinien avaient incorporé de l'EdU alors qu'aucun UFB n'en n'avait incorporé, et ce indépendamment du statut de la CDA. Ces résultats confirment que les ponts chromatinien correspondent à de l'ADN complètement répliqué en phase S tout en suggérant que les UFBs correspondent à de l'ADN non répliqué. Ces données supposent donc que la déficience en CDA pourrait compromettre la réplication de certaines séquences entraînant une accumulation d'ADN non répliqué en mitose qui donnerait lieu à la

formation d'UFBs. Néanmoins, ne pouvant pas exclure que la structure très fine des UFBs limite la détection de l'EdU qui aurait pu être incorporé, nous avons adopté des approches complémentaires afin de vérifier ces résultats.

La réplication de certaines séquences telles que les CFS peut être complétée en mitose, donnant lieu à des foyers de synthèse mitotique révélés par l'incorporation d'EdU en métaphase (Bergoglio *et al.*, 2013 ; Naim *et al.*, 2013). Afin de déterminer si la déficience en CDA compromet la réplication de certaines séquences avant la fin de la phase S, nous avons donc ajouté de l'EdU au milieu de culture durant la fin de phase G2/début de mitose. Nous avons ainsi montré que la perte d'expression de la CDA conduit à l'accumulation de cellules métaphasiques présentant des foyers de synthèse mitotique. De plus, nous avons observé que ces derniers étaient localisés à proximité des CFS et des centromères. Nous avons alors proposé que certains CFS et centromères pourraient ne pas être complètement répliqués dans les cellules déficientes en CDA lorsque celles-ci entrent en mitose, expliquant ainsi la nécessité d'une synthèse mitotique. En accord avec cette hypothèse, l'analyse de la réplication des centromères en prométaphase a montré que le pourcentage de centromères non répliqués en début de mitose était significativement plus élevé dans les cellules déficientes en CDA. De manière intéressante, un traitement des cellules avec 2 pM de CPT prévient non seulement l'augmentation de la fréquence des UFBs, mais également l'augmentation de la synthèse d'ADN mitotique et l'augmentation de la fréquence des centromères non répliqués observées en absence de la CDA. Ensemble, ces résultats apportent des preuves expérimentales confirmant que les UFBs proviennent de séquences d'ADN, préférentiellement localisées au niveau de sites difficiles à répliquer tels que les centromères ou les CFS, qui ne sont pas complètement répliquées en fin de phase S et qui perdurent en mitose. En outre, nous avons montré qu'un traitement avec une dose faible de CPT permet de prévenir à la fois l'accumulation de séquences d'ADN non répliquées en mitose, l'augmentation de la synthèse d'ADN mitotique et la formation d'UFBs créant un lien moléculaire inédit entre la non-réplication de certains sites difficiles à répliquer et la formation des UFBs.

La déficience en CDA est associée à une diminution de l'activité basale de PARP-1 qui conduit à la réplication incomplète de certaines séquences d'ADN promouvant ainsi la formation d'UFBs :

Etant donné qu'un traitement avec une faible dose de CPT permet de prévenir la totalité des phénotypes évoqués précédemment, nous avons cherché à identifier la cible de cette dernière qui permettrait d'expliquer son effet. La CPT, ainsi que d'autres stress génotoxiques, induisent l'activation de PARP-1 et la synthèse subséquente de PAR (Tallis *et al.*, 2013 ; Zhang *et al.*, 2011).

Nous avons donc déterminé si l'activité de PARP-1 pouvait être compromise dans les cellules déficientes en CDA. L'analyse du nombre de foyers de PARylation par immunofluorescence a ainsi montré que le niveau basal de PARylation est diminué de manière significative en absence de la CDA et qu'un traitement avec 2 pM de CPT permet de restaurer l'activité de PARP-1 à un niveau similaire à celui observé dans les cellules exprimant la CDA. Ce résultat suggère que la capacité de la CPT à prévenir les phénotypes observés auparavant est probablement due à la réactivation de PARP-1 ; ce que nous avons confirmé par un traitement avec de l' H_2O_2 . De plus, cela suppose que c'est la réduction de l'activité de PARP-1 qui serait à l'origine de la réplication incomplète de certaines séquences dans les cellules n'exprimant pas la CDA. En accord avec cette hypothèse, l'inhibition chimique de PARP-1 ou sa déplétion stable dans des cellules exprimant la CDA conduit à une augmentation du nombre de centromères non répliqués en début de mitose, à une augmentation de la synthèse d'ADN mitotique ainsi qu'à une augmentation de la fréquence des UFBs. De manière attendue, un traitement avec de la CPT ne permet pas de prévenir ces phénotypes lorsque PARP-1 n'est pas exprimée. L'ensemble de ces résultats démontre que l'augmentation de la fréquence des UFBs dans les cellules déficientes en CDA est liée à la réduction de l'activité de PARP-1, révélant par conséquent l'importance de l'activité basale de cette dernière pour permettre la réplication complète de l'ADN avant l'entrée en mitose, prévenant ainsi la formation d'UFBs surnuméraires.

Etonnamment, nous avons montré que la déplétion de PARP-1 conduit à une augmentation de la vitesse de progression des fourches de réplication alors que la perte d'expression de la CDA la ralentit (Chabosseau *et al.*, 2011). Ce résultat indique que les conséquences de la déficience en CDA sur la réplication complète de certaines séquences d'ADN ne sont pas liées à son effet sur la vitesse de progression des fourches de réplication. Cela établit ainsi pour la première fois que le déséquilibre du pool de nucléotides peut affecter la réplication, indépendamment de son action sur la vitesse des fourches de réplication, en compromettant l'activité de PARP-1.

La déficience en CDA conduit à un excès de dCTP qui réduit l'activité de PARP-1 et promeut la formation d'UFBs :

La déficience en CDA conduit à un déséquilibre du pool de pyrimidines se traduisant par l'accumulation intracellulaire de dCTP (Chabosseau *et al.*, 2011). Nous avons donc déterminé si l'augmentation de la concentration en dCTP pouvait expliquer la réduction de l'activité basale de PARP-1. L'ajout de désoxycytidine dans le milieu de culture de cellules exprimant la CDA permet de reproduire l'accumulation de dCTP observée en absence de la CDA (Chabosseau *et al.*, 2011). De façon intéressante, ce traitement entraîne une diminution de l'activité de PARP-1 corrélée à une

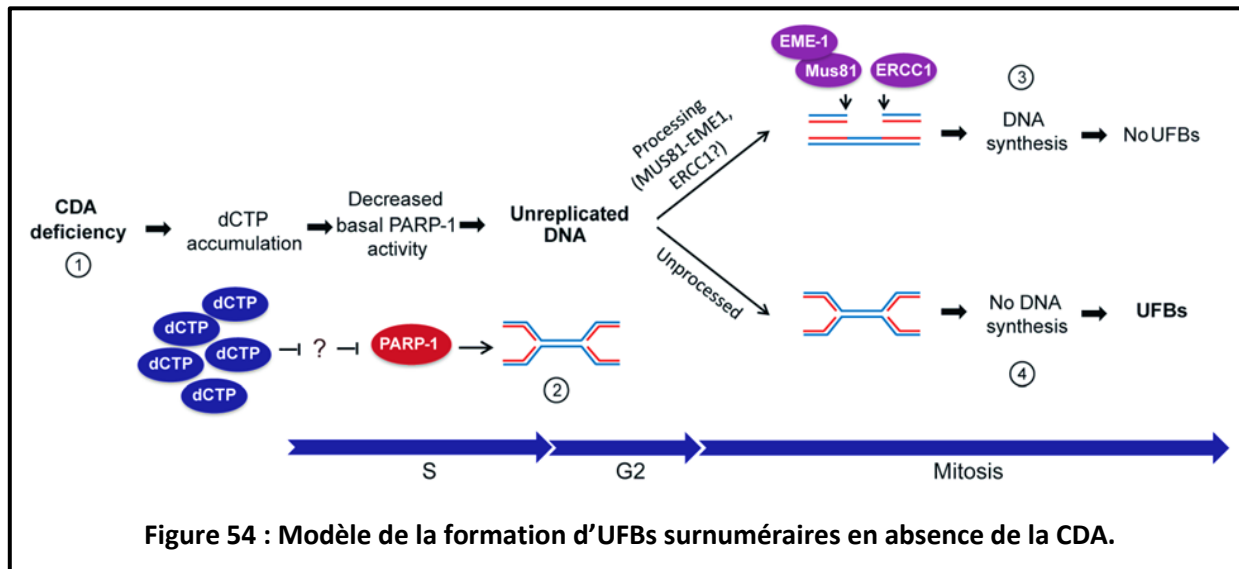
augmentation du nombre de centromères non répliqués en début de mitose et à une augmentation de la fréquence des UFBs. Ces résultats suggèrent que la réduction de l'activité basale de PARP-1 en absence de la CDA est la conséquence de l'accumulation intracellulaire de dCTP. En outre, nous avons montré qu'*in vitro*, la dCTP inhibait l'activité de la protéine PARP-1 recombinante. Cependant, l'ajout de faibles quantités de NAD^+ (une centaine de micromolaires) au regard de la concentration importante de dCTP nécessaire pour l'inhibition de PARP-1 recombinante (10mM) est suffisant pour annuler l'effet inhibiteur de la dCTP sur l'activité de PARP-1. Ces résultats, qui pourraient suggérer une compétition entre le NAD^+ et la dCTP pour le site actif de PARP-1, ne sont donc vraisemblablement pas compatibles en termes de concentrations dans des conditions physiologiques (cet aspect sera débattu dans la partie « Discussion »). Néanmoins, nos données *in vivo* montrent que l'ajout de dC au milieu de culture de cellules exprimant la CDA entraîne une diminution de l'activité basale de PARP-1, illustrant ainsi un rôle encore inédit du pool de nucléotides en tant que régulateur de l'activité de PARP-1.

En résumé, les principaux résultats de cette étude démontrent que :

- ① *L'augmentation de la fréquence des UFBs dans les cellules BS est due à la déficience en CDA et au déséquilibre du pool de pyrimidines subséquent. En revanche, l'augmentation de la fréquence des ponts chromatinien est une conséquence directe de la déficience en BLM. La déficience en CDA, en dehors du contexte du syndrome de Bloom, est également à l'origine d'une augmentation de la fréquence des UFBs, indépendamment de l'expression de BLM et de la lignée cellulaire.*
- ② *Les UFBs correspondent à des séquences d'ADN qui ne sont pas répliquées en fin de phase S et qui perdurent jusqu'à l'entrée en mitose.*
- ③ *L'activité de PARP-1 est nécessaire pour éviter l'accumulation d'ADN non répliqué en mitose, prévenant ainsi la formation d'UFBs surnuméraires.*
- ④ *L'ajout de dC au milieu de culture de cellules exprimant la CDA entraîne une diminution de l'activité basale de PARP-1, identifiant ainsi le pool de nucléotides comme un régulateur potentiel de l'activité de PARP-1.*

Nos résultats révèlent donc une conséquence encore inconnue d'un déséquilibre du pool de nucléotides, et révèlent un rôle inattendu de PARP-1 dans la prévention de l'accumulation d'ADN non répliqué en mitose, prévenant ainsi la formation d'anomalies mitotiques.

Sur la base de ces résultats nous avons proposé le modèle suivant : ① la déficience en CDA et l'augmentation subséquente de la concentration de dCTP intracellulaire conduit à la réduction de l'activité enzymatique de PARP-1. ② L'activité réduite de cette dernière est à l'origine de l'accumulation de séquences d'ADN non répliquées en fin de phase S et perdurant en mitose. ③ Une partie de ces séquences est prise en charge par des mécanismes incluant l'activité de nucléases telles que Mus81 et une synthèse d'ADN mitotique. ④ L'excès d'ADN non répliqué qui n'est pas pris en charge par les nucléases conduit à la formation d'UFBs en anaphase (Figure 54).



RESEARCH ARTICLE

Pyrimidine Pool Disequilibrium Induced by a Cytidine Deaminase Deficiency Inhibits PARP-1 Activity, Leading to the Under Replication of DNA

Simon Gemble^{1,2}, Akshay Ahuja³, Géraldine Buhagiar-Labarchède^{1,2}, Rosine Onclercq-Delic^{1,2}, Julien Dairou⁴, Denis S. F. Biard⁵, Sarah Lambert^{1,2}, Massimo Lopes³, Mounira Amor-Guélet^{1,2*}

1 Institut Curie, Centre de Recherche, Orsay, France, **2** CNRS UMR 3348, Stress Génotoxiques et Cancer, Centre Universitaire, Orsay, France, **3** Institute of Molecular Cancer Research, University of Zurich, Zurich, Switzerland, **4** Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative (BFA) UMR 8251 CNRS, Plateforme Bioprofiler Bâtiment Buffon, 346A Case 7073, Paris, France, **5** CEA, DSV, IMETI, SEPIA, Fontenay-aux-Roses Cedex, France

* mounira.amor@curie.fr



OPEN ACCESS

Citation: Gemble S, Ahuja A, Buhagiar-Labarchède G, Onclercq-Delic R, Dairou J, Biard DSF, et al. (2015) Pyrimidine Pool Disequilibrium Induced by a Cytidine Deaminase Deficiency Inhibits PARP-1 Activity, Leading to the Under Replication of DNA. *PLoS Genet* 11(7): e1005384. doi:10.1371/journal.pgen.1005384

Editor: Nancy Maizels, University of Washington School of Medicine, UNITED STATES

Received: January 27, 2015

Accepted: June 23, 2015

Published: July 16, 2015

Copyright: © 2015 Gemble et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by Institut Curie (<http://curie.fr>), Centre National de la Recherche Scientifique (<http://www.cnrs.fr/>), Ligue contre le Cancer (<http://www.ligue-cancer.net/>), Cancéropôle/ Région Ile de France (<http://www.canceropole-idf.fr/>), Association pour la Recherche sur le Cancer (<http://www.fondation-arc.org/>), Ministère de l'Education, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (<http://www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/>), Swiss

Abstract

Genome stability is jeopardized by imbalances of the dNTP pool; such imbalances affect the rate of fork progression. For example, cytidine deaminase (CDA) deficiency leads to an excess of dCTP, slowing the replication fork. We describe here a novel mechanism by which pyrimidine pool disequilibrium compromises the completion of replication and chromosome segregation: the intracellular accumulation of dCTP inhibits PARP-1 activity. CDA deficiency results in incomplete DNA replication when cells enter mitosis, leading to the formation of ultrafine anaphase bridges between sister-chromatids at “difficult-to-replicate” sites such as centromeres and fragile sites. Using molecular combing, electron microscopy and a sensitive assay involving cell imaging to quantify steady-state PAR levels, we found that DNA replication was unsuccessful due to the partial inhibition of basal PARP-1 activity, rather than slower fork speed. The stimulation of PARP-1 activity in CDA-deficient cells restores replication and, thus, chromosome segregation. Moreover, increasing intracellular dCTP levels generates under-replication-induced sister-chromatid bridges as efficiently as PARP-1 knockdown. These results have direct implications for Bloom syndrome (BS), a rare genetic disease combining susceptibility to cancer and genomic instability. BS results from mutation of the *BLM* gene, encoding BLM, a RecQ 3'-5' DNA helicase, a deficiency of which leads to CDA downregulation. BS cells thus have a CDA defect, resulting in a high frequency of ultrafine anaphase bridges due entirely to dCTP-dependent PARP-1 inhibition and independent of BLM status. Our study describes previously unknown pathological consequences of the distortion of dNTP pools and reveals an unexpected role for PARP-1 in preventing DNA under-replication and chromosome segregation defects.

National Science Foundation (<http://www.snf.ch/fr/>), and the Swiss National Foundation ProDoc Program Biology (<http://www.snf.ch/fr/>). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Author Summary

The maintenance of genome stability is essential for the accurate transmission of genetic information, to ensure the successful duplication of chromosomes and their even segregation during mitosis. Errors occurring during DNA replication may affect both the accuracy of chromosome duplication and the balance of chromosome segregation during mitosis. Accurate DNA replication is strongly dependent on deoxynucleotides (dNTP) concentrations. Distortions in dNTP pool affect the rate of replication fork progression and compromise genetic stability. In the work presented here, we identified a novel mechanism by which dNTP pool disequilibrium compromises the completion of DNA replication and thus chromosome segregation, independently of the rate of fork progression. This mechanism involves the intracellular accumulation of deoxycytidine due to cytidine deaminase (CDA) deficiency, inhibiting PARP-1 activity. These results have direct implications for Bloom syndrome (BS), a rare genetic disease combining susceptibility to cancer and genomic instability. BS cells also have a CDA defect, resulting in a high frequency of ultrafine anaphase bridges due entirely to dCTP-dependent PARP-1 inhibition. These data highlight new pathological consequences of the distortion of dNTP pools and reveal an unexpected role for PARP-1 in preventing the accumulation of excessive amounts of unreplicated DNA and chromosome segregation defects.

Introduction

DNA replication is a fundamental cellular process that ensures duplication of the genetic information and subsequent transfer to daughter cells. The accuracy of DNA replication can be hampered by various exogenous and endogenous stresses, threatening genome integrity. It has become clear that replication stress, due to disturbance of the DNA replication program, is a major source of genome instability early during cancer development. Replication stress is defined as any phenomenon that alters the fulfillment of the DNA replication program. These phenomena include alteration of the initiation and elongation steps of DNA replication, conflicts between DNA replication and metabolic pathways such as transcription and mRNA processing, nucleotide pool disequilibrium, and overexpression or activation of oncogenes [1–4]. Some loci in the human genome are particularly difficult to replicate. They include common fragile sites (CFSs) that have a high A-T content and origin-poor regions, and such loci are prone to the formation of secondary structures and late replication [5, 4]. Such "difficult to replicate" regions are very sensitive to replication stress. Such stress can jeopardize the completion of their replication, with the possibility of the formation of intertwined sister chromatid bridges during mitosis [6].

There are two types of sister-chromatid anaphase bridges: chromatin bridges, consequences of defective sister chromatid segregation [7], can be stained with conventional dyes, such as DAPI; and ultrafine anaphase bridges (UFBs), which cannot be stained with conventional DNA dyes or antibodies against histones [8, 9]. UFBs were discovered only recently, and are generally identified by the detection of the helicase-like protein, PICH (Plk1-interaction checkpoint "helicase"). They have been found in all cultured normal cells tested, and are therefore probably physiological structures [10]. However, their prevalence often increases in constitutive or induced replication stress conditions, such as Bloom syndrome and the inhibition of replication progression, respectively. [9, 11, 12] As cells progress through anaphase, UFBs are progressively stretched and decrease in number, as they are resolved. Most UFBs detected in normal cells are of centromeric origin: they are thought to contain unresolved DNA

catenations between the centromeres separating during anaphase [9]. However, some UFBs, of common fragile site origin [11, 13] (CFS-associated UFBs), are induced by treatment with the replication inhibitor aphidicolin and are detected through the binding of FANCD2/FANCI protein complexes to bridge ends. Defects in either FANCD2 or its partner FANCI are involved in Fanconi anemia syndrome, and these proteins have been reported to co-localize with fragile sites [14]. UFBs, the origin and function of which remain unclear, do not result from recombination intermediates [15, 16]. They may correspond to replication intermediates persisting on entry into mitosis, reflecting a failure to complete DNA replication or to resolve sister chromatid catenanes fully [6, 17]. As CFS are replicated late and associated with loci poor in replication initiation events [18, 19], it has been suggested that CFS-associated UFBs originate from DNA incompletely replicated when the cell enters mitosis [11].

In cells from Bloom syndrome (BS) patients, chromatin bridges and PICH-positive UFBs are abnormally frequent [9]. The correlation between chromosomal instability and an increased risk of malignancy at an early age is stronger in BS than other pathological or physiological situations [20]. BS is a consequence of mutations in both copies of the *BLM* gene which encodes a 3'-5' DNA helicase identified as a member of the RecQ family [21]. A characteristic of BLM-deficient cells is the frequency of sister chromatid exchange (SCEs) [22]. The BS cellular phenotype also includes chromosome breaks, slow replication fork speed, and high frequencies of both blocked replication forks and anaphase bridges [23, 24]. These cellular features reflect the presence of endogenous DNA damage, replication stress and chromosome segregation defects and implicate BLM in favoring faithful duplication of the genome. However, we and others have reported that BLM deficiency leads to the downregulation of cytidine deaminase (CDA) [25, 26], an enzyme of the pyrimidine salvage pathway. CDA catalyzes the hydrolytic deamination of cytidine and deoxycytidine (dC) to uridine and deoxyuridine (dU), respectively [27]. CDA deficiency causes excess dCTP leading to nucleotide pool disequilibrium. Some of the genetic instability associated with BLM deficiency, including the slow replication fork progression and about 30% of the increased sister chromatid exchange (SCE) frequency, results from a pyrimidine pool imbalance due to the CDA defect [25]. Whether other cellular defects associated with BS phenotype are due to CDA deficiency remains to be established.

Here, we investigated the mechanism underlying the increase in UFB frequency in BS cells and its possible relationship to pyrimidine pool disequilibrium. We demonstrate that the formation of supernumerary UFBs, but not chromatin bridges, is fully due to defective CDA and not to the BLM defect *per se*. The increase in the dCTP pool resulting from CDA defect leads to a significant reduction of basal PARP-1 activity. PARP-1 is a multifunctional protein involved in diverse physiological processes and in the response to DNA damage [28]. Lower basal PARP-1 activity causes higher frequencies of unreplicated centromeres, foci of mitotic DNA synthesis and (UFB)-containing unreplicated DNA, without replication fork speed being affected.

Our investigations reveal a novel mechanism of UFB formation and new pathological consequences of the distortion of dNTP metabolism fluxes. These findings imply that the effects of nucleotide pool disequilibrium may be more far-reaching than previously thought, and include jeopardizing genome stability not only through the regulation of fork progression, but also by reducing PARP-1 activity. We also provide evidence that PARP-1 has a previously unsuspected role in preventing replication stress and chromosome segregation defects.

Results

CDA prevents supernumerary UFB formation in BS cells and in cells expressing BLM

We investigated whether the higher frequency of anaphase bridges in BLM- and CDA-deficient cells derived from BS patients (BS cells, BLM-/CDA-) was due to CDA deficiency itself. The characteristics of all the cell lines used in this study are presented in [Table 1](#). The expression of GFP-BLM in BS cells (BS-BLM) restores the expression of both BLM and CDA (BLM+/CDA+), as well as nucleotide pool equilibrium [25]. We analyzed the frequencies of chromatin bridges and UFBs in these cells by DAPI and PICH antibody staining, respectively ([Fig 1A](#)). The numbers of both chromatin bridges and UFBs were lower in BS-BLM cells (BLM+/CDA+) than in control cells (BS-Ctrl_(BLM), BLM-/CDA-), as previously reported [9]. The stable overexpression of CDA in BS cells (BS-CDA, BLM-/CDA+) restored the nucleotide pool equilibrium but did not restore BLM expression [25]; the frequency of UFBs in these cells was similar to that in BS-BLM cells (BLM+/CDA+), whereas the frequency of chromatin bridges remained similar to that observed in BS control cells (BS-Ctrl_(CDA), BLM-/CDA-) ([Fig 1A and 1B](#)). UFBs originating from the centromere and CFS were similarly affected in CDA-deficient cells (BS-Ctrl_(BLM) and BS-Ctrl_(CDA)) ([Fig 1A and S1A Fig](#)). CDA expression in BS cells (BS-BLM and BS-CDA) significantly increased the percentage of cells with no UFBs and substantially decreased the frequency of cells with more than three UFBs, indicating that the entire BS cell population is affected by CDA deficiency ([S1B and S1C Fig](#)). These results suggest that supernumerary UFBs in BS cells result from the CDA defect and that the increase in chromatin bridge frequency may result directly from BLM deficiency.

To verify these findings, we constructed cells stably expressing both BLM and CDA under the control of the CMV promoter (BS-BLM-CDA); this construct allowed the subsequent downregulation of BLM without downregulating CDA. In this model, CDA overexpression had no effect on the frequencies of chromatin bridges and UFBs ([S1D Fig](#)); however, siRNA-mediated CDA downregulation (BS-BLM-CDA-siCDA, BLM+/CDA-) increased UFB frequency to the levels observed in BS control cells (BS-Ctrl_(BLM/CDA)-siCtrl, BLM-/CDA-), without affecting chromatin bridge frequency ([Fig 1C](#)). Also, siRNA-mediated BLM downregulation (BS-BLM-CDA-siBLM, BLM-/CDA+) increased the chromatid bridge frequency to that in control BS cells (BS-Ctrl_(CDA)-siCtrl, BLM-/CDA-), without affecting UFB frequency ([Fig 1C](#)). Thus, BLM prevents increases in chromatin bridge frequency, whereas CDA prevents increases in UFB frequency. We used tetrahydrouridine (THU), a potent CDA

Table 1. Characteristics of cell lines.

Cell lines	Origin of cell lines	Antibiotics	Integrated vectors	BLM status	CDA status	PARP-1 status	References
BS-Ctrl _(BLM)	GM8505B (derived from BS patient)	G418	EGFP-C1	-	-	+	[25]
BS-BLM			EGFP-C1-BLM	+	+	+	
BS-Ctrl _(CDA)	BS-Ctrl _(BLM)	G418 + puromycin	EGFP-C1 + pCI	-	-	+	
BS-CDA			EGFP-C1 + pCI-CDA	-	+	+	
BS-BLM-Ctrl	BS-BLM	G418 + puromycin	EGFP-C1-BLM + pCI	+	+	+	In this study
BS-BLM-CDA			EGFP-C1-BLM + pCI-CDA	+	+	+	
HeLa-Ctrl _(CDA)	HeLa	Puromycin	pGIPZ	+	+	+	
HeLa-shCDA			pGIPZ-shCDA	+	-	+	
HeLa-Ctrl _(PARP-1)	HeLa	Hygromycin B	pEBV	+	+	+	[46]
HeLa-shPARP-1			pEBV-shPARP-1	+	+	-	

doi:10.1371/journal.pgen.1005384.t001

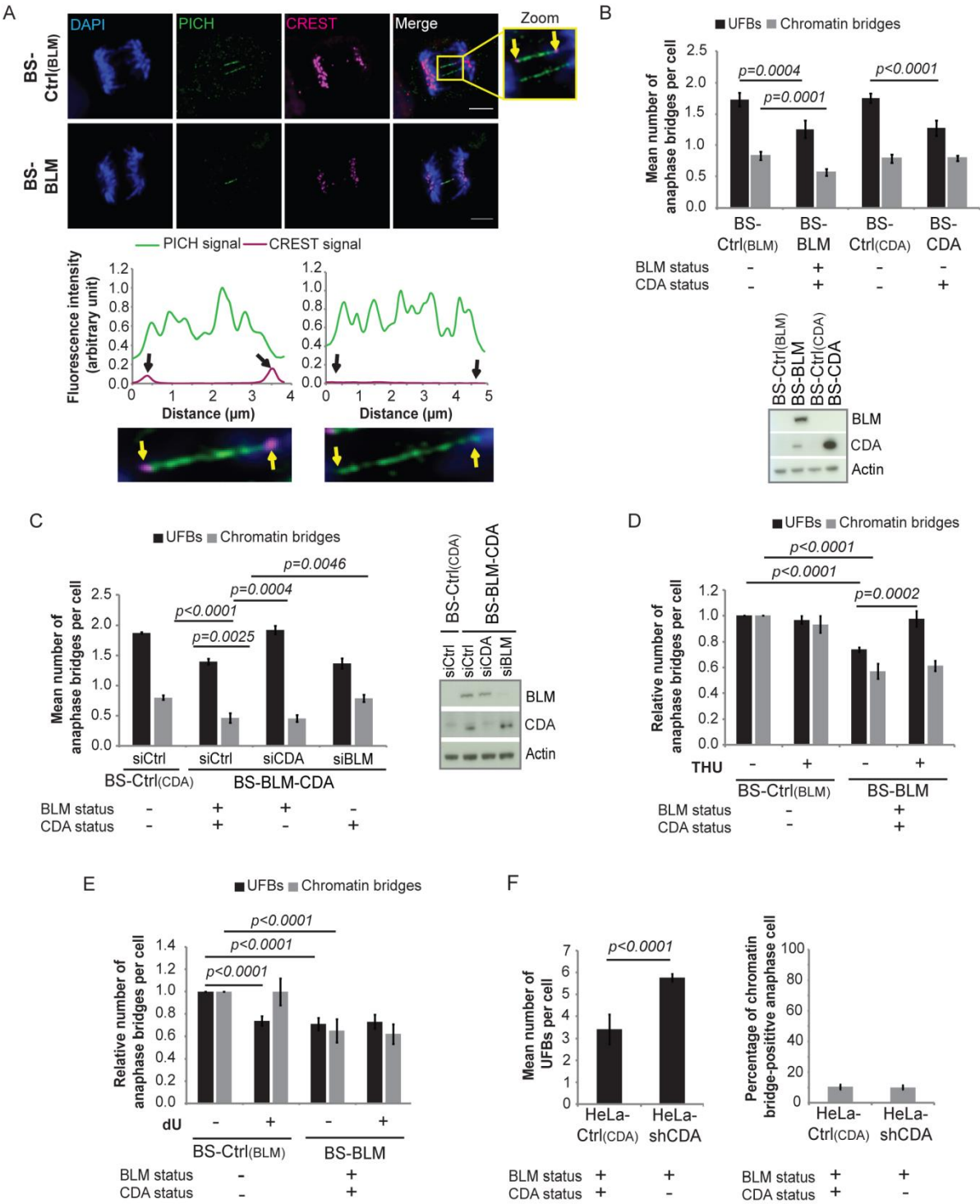


Fig 1. CDA prevents supernumerary UFB formation in BS cells and in cells expressing BLM. (A) Upper panel: Representative immunofluorescence deconvoluted z-projection images of PICH-positive UFBs in BS-Ctrl_(BLM) and in BS-BLM anaphase cells. DNA was visualized by DAPI staining (blue). Centromeres were stained with CREST serum (in magenta) and UFBs were stained with PICH antibody (in green). In the enlarged image, CREST foci at the extremities of the UFB are indicated by yellow arrows. Scale bar: 5 μ m. Lower panel: Fluorescence quantifications along UFBs using Image J. CREST-positive UFBs are characterized by CREST fluorescence signal at the extremities (left). CREST-negative UFBs present no CREST signal (right). (B) Mean number of UFBs (black bars) and chromatin bridges (gray bars) per anaphase cell in BS-Ctrl_(BLM), BS-BLM, BS-Ctrl_(CDA) and BS-CDA cell lines (upper panel); BLM and CDA levels, assessed by immunoblotting (lower panel). Errors bars represent means \pm SD from five independent experiments (> 170 anaphase cells per condition (UFBs) or > 95 anaphase cells per condition (chromatin bridges)). (C) Mean number of UFBs (black bars) and of chromatin bridges (gray bars) per anaphase cell in BS-Ctrl_(CDA) cells and in BS-BLM-CDA cells transiently transfected with the indicated siRNAs (left panel); BLM and CDA levels, assessed by immunoblotting (right panel). Errors bars represent means \pm SD from three independent experiments (> 120 anaphase cells per condition (UFBs) or > 70 anaphase cells per condition (chromatin bridges)). (D-E) Relative numbers of UFBs (black bars) and of chromatin bridges (gray bars) per anaphase cell in BS-Ctrl_(BLM) and BS-BLM cell lines left untreated or treated with (D) 100 μ M tetrahydrouridine (THU) or (E) 100 μ M deoxyuridine (dU). Error bars represent means \pm SD from: (D) five independent experiments (> 140 anaphase cells per condition (UFBs) or > 95 anaphase cells per condition (chromatin bridges)), (E) five independent experiments (> 120 anaphase cells per condition (UFBs) or > 95 anaphase cells per condition (chromatin bridges)). (F) Mean number of UFBs per cell (left panel), and percentage of chromatin bridge-positive anaphase cells (right panel) in HeLa-Ctrl_(CDA) and HeLa-shCDA cells. Error bars represent means \pm SD from six independent experiments (> 155 anaphase cells per condition (UFBs) or > 100 anaphase cells per condition (chromatin bridges)). The significance of differences was assessed with Student's *t*-test.

doi:10.1371/journal.pgen.1005384.g001

inhibitor [29] that does not modify CDA levels, to confirm these findings (S1E Fig). THU treatment induced a 33% increase in UFB frequency in CDA-expressing cells (BS-BLM, BLM +/CDA+), without affecting chromatin bridge frequency, but did not affect frequencies of UFBs and chromatin bridges in CDA-deficient cells (BS-Ctrl_(BLM), BLM-/CDA-) (Fig 1D). Thus, the effect of THU, increasing UFB prevalence, was dependent on CDA, confirming that THU is a specific inhibitor of CDA, as previously reported [29]. BS cells (BS-Ctrl_(BLM), BLM-/CDA-) were cultured in the presence of dU (dU is the final product of CDA, so its addition mimics CDA activity [25] without modifying CDA expression; S1E Fig): UFB frequency was 29% lower in BS cells cultured with than without dU, whereas chromatin bridge frequency did not differ (Fig 1E). Supplementation with dU had no effect on UFB or chromatin bridge frequencies in CDA-expressing cells (BS-BLM, BLM+/CDA+) (Fig 1E). These findings demonstrate that the abnormally high frequency of chromatin bridges in cells from BS patients is caused by the BLM deficiency whereas that of UFBs is due to the CDA deficiency.

We confirmed these findings in another cellular model based on an adenoviral short hairpin RNA (shRNA) specific for CDA to downregulate CDA stably in HeLa cells (HeLa-shCDA). The CDA downregulation was highly efficient, with no detectable CDA protein and significantly less CDA mRNA than in controls (S1F Fig). The CDA depletion in this model resulted in dCTP accumulation, replication fork slowing and an increase in SCE frequency, reproducing the part of the BS phenotype associated with CDA deficiency [25] (S1G, S1H and S1I Fig). UFB frequency was 41% higher in HeLa-shCDA cells than in control cells, whereas chromatin bridge frequency was unaffected (Fig 1F). These results were confirmed in four additional independent HeLa-shCDA clones, to check that they were not due to a clonal artifact. The UFB frequency in CDA-depleted HeLa cells was decreased by 25% by dU treatment, whereas that in control HeLa cells was increased by 34% by THU treatment (S1J Fig). These experiments further confirm the role of CDA in preventing UFB formation in BLM-expressing cells.

Thus, all supernumerary UFBs in BS cells result from the CDA deficiency, and CDA prevents supernumerary UFB whether or not BLM is expressed.

UFB formation does not result from DNA replication fork uncoupling

Our data indicate that a CDA defect, and thus pyrimidine pool disequilibrium, results in an increase in the prevalence of centromere and CFS-associated UFBs. Arlt and Glover (2010) showed that very low doses of camptothecin (CPT) greatly decreased the frequency of CFS gaps and breaks upon replication stress, and the amount of single-stranded DNA at stalled replication forks. On the basis of these results, the authors suggested that polymerase-helicase

uncoupling is a key initial event in CFS instability. They suggested that the slowing of the replication fork might cause such uncoupling, generating genetic instability [30].

We, therefore, first investigated whether very low doses of CPT could rescue UFB formation in the absence of CDA. We treated CDA-deficient cells and their corresponding CDA-expressing control cells with 2 pM CPT for 10 hours (S and G2 phases of the cell cycle, Fig 2A) or 3 hours (G2 phase; Fig 2D) [31]; we verified that this treatment did not affect CDA expression or the cell cycle (S2A and S2B Fig). In CDA-deficient cells, but not CDA-expressing cells, UFB frequency was significantly decreased by CPT treatment but only if it was administered during both the S and G2 phases (Fig 2B, 2C and 2E). Thus, as reported for CFS instability, treatment with 2 pM CPT during S-phase abolished the excess of UFBs in CDA-deficient cells.

We then investigated whether replication uncoupling could be responsible for UFB formation. Replication uncoupling is thought to result in long stretches of single-stranded DNA (ssDNA) [30] potentially detectable by electron microscopy (EM). We analyzed replication intermediates from CDA-depleted and control HeLa cells, treated or not treated with CPT, but observed no significant differences in the lengths of ssDNA at replication forks between the four conditions tested (S2C–S2E Fig). Thus, neither CDA depletion nor 2 pM CPT treatment induced detectable changes in the length of ssDNA stretches at replication forks. However, CDA-deficient cells displayed a marked accumulation of ssDNA gaps, visible on both replicated and parental duplexes (S2C and S2F Fig), consistent with impaired ssDNA gap repair in these cells. This is also consistent with our results showing a constitutive activation of both γ H2AX and Chk2 in CDA-depleted HeLa cells (S2G Fig), as previously reported in BS cells [24]. Moreover, as for other conditions affecting the integrity of the replication template [32], the accumulation of ssDNA gaps in untreated CDA-depleted cells was associated with an increase in the frequency of reversed forks. As described for more acute CPT treatments [33, 34], 2 pM CPT treatment increased the frequency of both ssDNA gaps and reversed forks, regardless of CDA status (S2F and S2H Fig).

These findings suggest that the slowing of replication in CDA-depleted cells is not accompanied by generalized replication fork uncoupling, but rather with marked accumulation of ssDNA gaps and the associated increase in fork reversal. The accumulation of UFBs in CDA-deficient cells thus appears to be a consequence of other phenomena, which is suppressed by mild CPT treatment, through a molecular mechanism unrelated to fork uncoupling.

CDA deficiency prevents the completion of DNA replication by the end of S phase, leading to the formation of UFB-containing unreplicated DNA

We thus investigated the alternative molecular mechanism by which CDA deficiency contributes to supernumerary UFB formation. UFBs may be derived from unreplicated DNA or from double-stranded DNA catenanes [9]. UFBs cannot be stained by conventional DNA dyes, so we directly labeled DNA during the S and G2 phases of the cell cycle [31]. Cells were incubated for 10 hours with the thymidine analog 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) and studied for bridges in anaphase (Fig 3A). In both CDA-depleted HeLa cells and control cells, EdU incorporation was detected in all chromatin bridges, but not in UFBs (Fig 3B and 3C). We cannot exclude the possibility that the thinness of UFB DNA structures limits EdU detection, but these data suggest that UFBs do not contain replicated DNA and might be derived from unreplicated DNA. We explored this hypothesis with other approaches.

The replication of some chromosomal loci, such as CFS, may be completed during late G2 or early mitosis [35, 36]. We thus investigated whether CDA deficiency could lead to detectable DNA synthesis during mitosis that would reflect under-replication of some chromosomal loci by the end of S phase. We therefore labeled CDA-depleted HeLa cells and control cells with

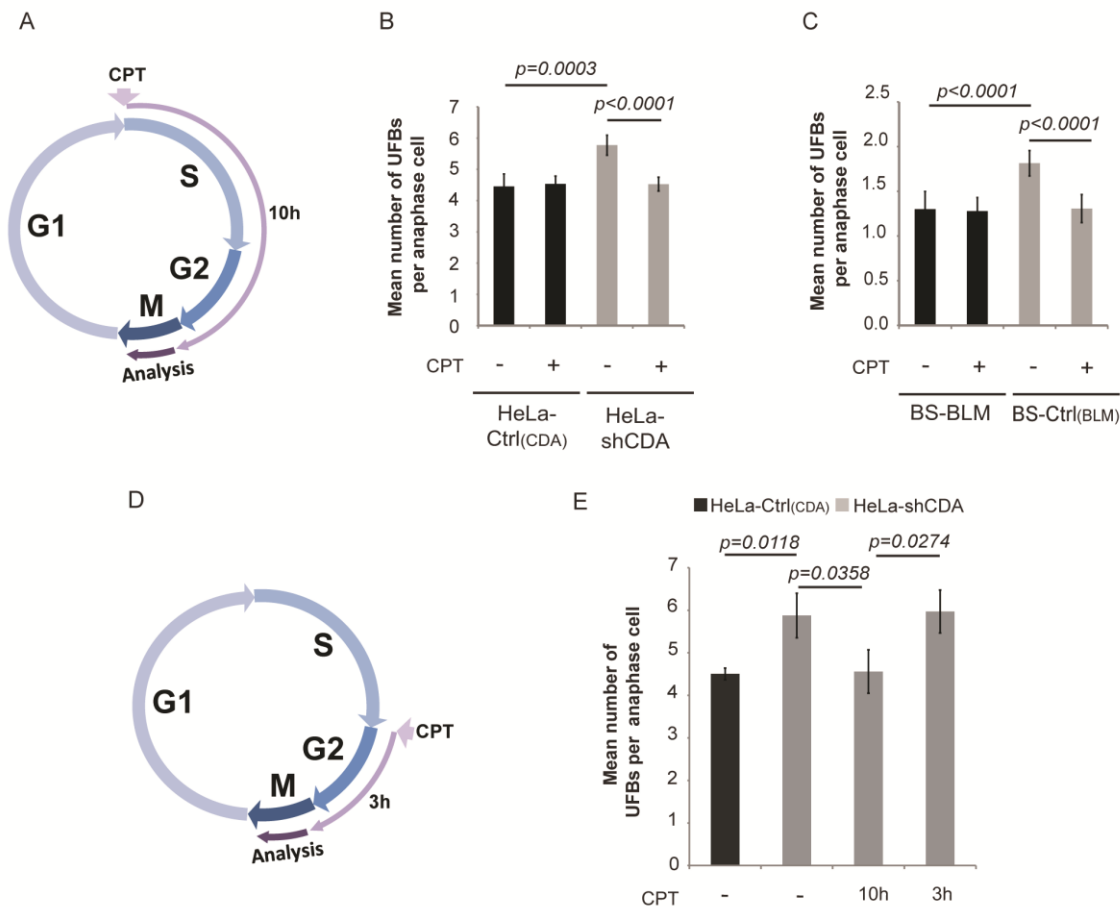


Fig 2. The formation of UFB-containing unreplicated DNA does not result from DNA replication fork uncoupling. (A) Schematic representation of 10 hours of treatment with 2 pM CPT during the cell cycle; only cells treated during the S and G2 phases were analyzed in anaphase. (B) Mean number of UFBs per anaphase cell, for HeLa-Ctrl(CDA) (black bars) and HeLa-shCDA (gray bars) cells left untreated or treated with 2 pM CPT. Error bars represent means \pm SD from six independent experiments (> 230 cells per condition). (C) Mean number of UFBs per anaphase cell, for BS-Ctrl(BLM) and BS-BLM cells left untreated or treated with 2 pM CPT. Error bars represent means \pm SD from six independent experiments (> 150 cells per condition). (D) Schematic representation of 3 hours of treatment with 2 pM CPT during the cell cycle; only cells treated during G2 phase were analyzed in anaphase. (E) Mean number of UFBs per anaphase cell in untreated HeLa-Ctrl(CDA) (black bars) and in HeLa-shCDA (gray bars) cells left untreated or treated for 10 or 3 hours with 2 pM CPT. Error bars represent means \pm SD from three independent experiments (> 90 anaphase cells per condition). The significance of differences was assessed with Student's *t*-test.

doi:10.1371/journal.pgen.1005384.g002

EdU for 1 hour and analyzed the following mitosis (Fig 3D). EdU foci in mitosis were significantly more numerous in CDA-depleted than control HeLa cells (Fig 3E and 3F). About 55% of the EdU foci colocalized with CREST foci and about 24% of the EdU foci colocalized with FANCD2 foci, independently of the presence or absence of CDA (S3 Fig). Using the Image J macro “confined displacement algorithm” [37], we confirmed that the percentage of colocalization between EdU foci and CREST or FANCD2 foci was significantly different from that expected if the colocalization occurred by chance ($p < 0.05$).

As the excess of UFBs was abolished by CPT treatment in CDA-depleted cells, we analyzed the effect of CPT treatment on mitotic DNA synthesis. We found that the CPT treatment of CDA-depleted HeLa cells also prevented the accumulation of mitotic cells presenting EdU foci

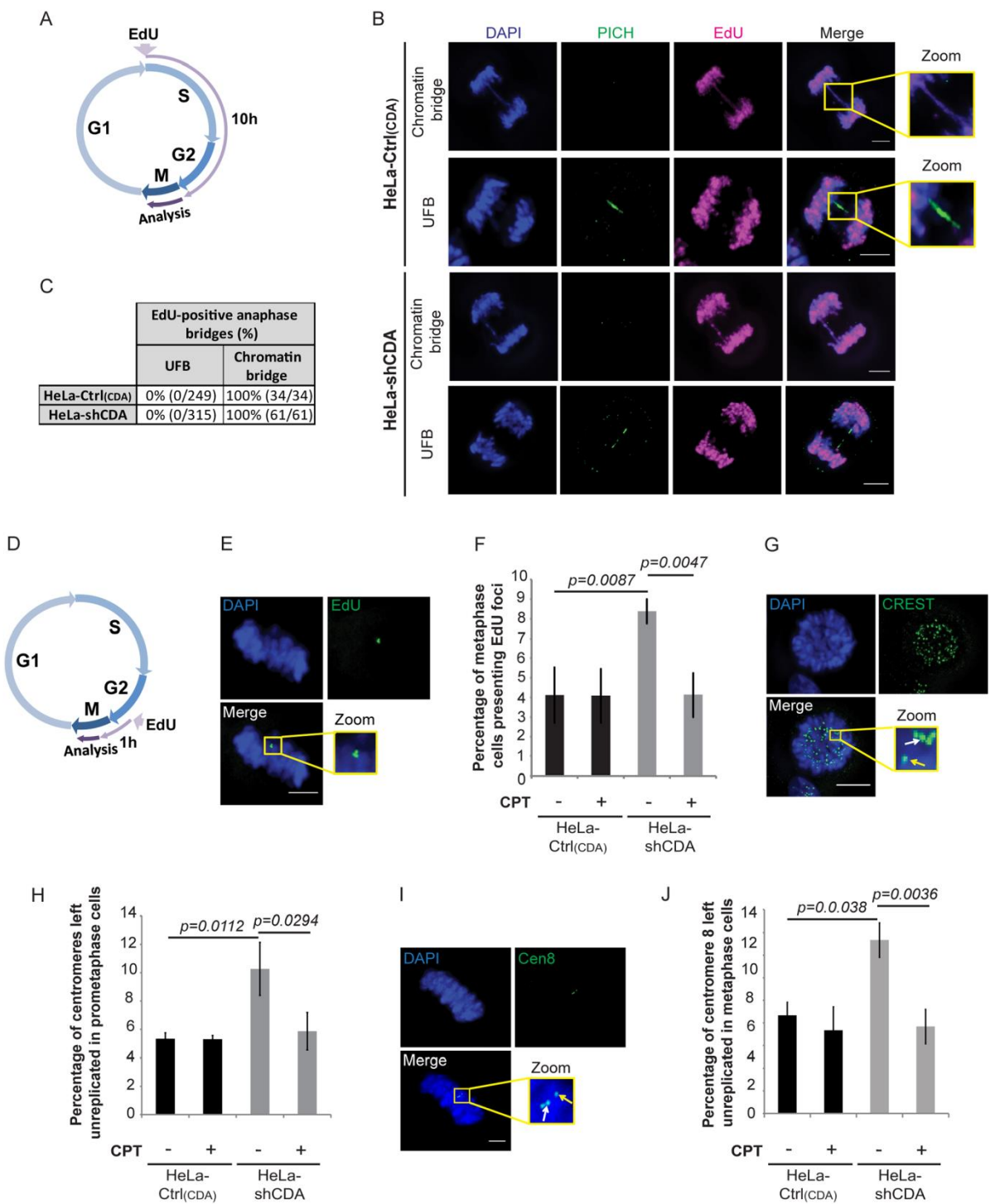


Fig 3. CDA deficiency impedes the completion of DNA replication by the end of S phase, leading to the formation of UFB-containing unreplicated DNA. (A) Schematic representation of 10 hours of EdU labeling during the cell cycle; only cells incorporating EdU during the S and G2 phases were analyzed in anaphase. (B) Representative immunofluorescence deconvoluted z-projection images of HeLa-Ctrl_(CDA) and HeLa-shCDA cells showing EdU incorporation into chromatin bridges but not into PICH-positive UFBs. DNA was visualized by DAPI staining (blue). EdU was stained with Alexa Fluor 555 (in magenta) and UFBs were stained with PICH antibody (in green). Enlarged images show a chromatin bridge with EdU incorporation (upper panels) and a PICH-positive UFB with no EdU incorporation (lower panels). (C) Table showing the percentage of EdU incorporation into chromatin bridges and UFBs in HeLa-Ctrl_(CDA) and HeLa-shCDA cells. (D) Schematic representation of 1 hour of EdU labeling during the cell cycle; only cells incorporating EdU during late G2 and early mitosis were analyzed in metaphase. (E) Representative immunofluorescence deconvoluted z-projection images of a metaphase HeLa-Ctrl_(CDA) cell with EdU incorporation. DNA was visualized by DAPI staining (blue). EdU was stained with Alexa Fluor 555 (in green). Enlarged images show three EdU foci on mitotic chromosomes. (F) Percentage of HeLa-Ctrl_(CDA) (black bars) and HeLa-shCDA (gray bars) metaphase cells left untreated or treated with 2 pM CPT and presenting EdU foci. Error bars represent means \pm SD for three independent experiments (> 120 metaphase cells per condition). (G) Representative immunofluorescence deconvoluted z-projection images of a prometaphase HeLa-Ctrl_(CDA) cell. DNA was visualized by DAPI staining (blue). Centromeres were stained with CREST serum (in green). Boxed images are enlarged; single-dotted CREST foci are indicated by yellow arrows and double-dotted CREST foci are indicated by white arrows. (H) Percentage of centromeres left unreplicated in HeLa-Ctrl_(CDA) (black bars) and in HeLa-shCDA (gray bars) prometaphase cells left untreated or treated with 2 pM CPT. Error bars represent means \pm SD from three independent experiments (> 95 prometaphase cells per condition). (I) Representative immunofluorescence deconvoluted z-projection images of a metaphase HeLa-Ctrl_(CDA) cell. DNA was visualized by DAPI staining (blue). Chromosome 8 centromeres were stained with the Cen-8 probe (in green). Boxed images are enlarged; single-dotted centromere 8 foci are indicated by yellow arrows and double-dotted centromere 8 foci are indicated by white arrows. (J) Percentage of chromosome 8 centromeres left unreplicated in HeLa-Ctrl_(CDA) (black bars) and in HeLa-shCDA (gray bars) metaphase cells left untreated or treated with 2 pM CPT. Error bars represent means \pm SD from three independent experiments (> 115 metaphase cells per condition). Scale bar: 5 μ m. Statistical significance was calculated with Student's *t*-test.

doi:10.1371/journal.pgen.1005384.g003

(Fig 3F). Thus, both centromeres and CFSs are replicated particularly late in the absence of CDA, raising the possibility that some of these loci remain unreplicated when the cell enters mitosis. Importantly, CPT treatment abolished the excess of both mitotic DNA synthesis and UFBs in CDA-deficient cells, establishing a molecular link between the late replication of centromeres and CFSs, and UFB prevalence.

We then hypothesized that not all centromeres and CFS are fully replicated in cells lacking CDA when entering mitosis. We used CREST staining and FISH (fluorescence *in situ* hybridization)-based assay with a centromeric probe specific for chromosome 8 (Cen-8) to investigate whether centromere replication was impaired in CDA-deficient cells (double-dotted and single-dotted CREST or Cen-8 foci, indicating fully replicated and unreplicated centromeres, respectively). The frequency of unreplicated centromeres was significantly higher in prometaphase/metaphase CDA-depleted HeLa cells than in the corresponding control cells, further evidence that UFBs arise from unreplicated DNA (Fig 3G–3J). The CPT treatment of CDA-depleted HeLa cells also prevented the accumulation of unreplicated centromeres, indicating that defective centromere replication is likely a source of mitotic DNA synthesis and UFBs.

Altogether, these data suggest that in CDA-deficient cells, some “difficult-to-replicate sites”, such as centromeres and CFS, are replicated particularly late, or even left unreplicated, leading to UFB formation. DNA synthesis events during mitosis may help rescue the duplication of some of these loci. However, many may not be processed by mitotic DNA synthesis, resulting in UFB formation. Importantly, CPT treatment rescued the defect in centromere replication, mitotic DNA synthesis and the excess of UFBs, providing a molecular link between compromised replication at “difficult to replicate sites” and UFB formation.

CDA deficiency is associated with weak basal PARP-1 activity, leading to incomplete replication of DNA, promoting UFB formation

We investigated how CPT treatment counteracts the effects of CDA deficiency. CPT and other genotoxic agents activate PARP-1 (Poly(ADP-ribose) polymerase-1), a multifunctional protein preventing genetic instability in response to DNA damage and replication stress [28, 38]. PARP-1 catalyzes poly(ADP-ribosyl)ation (PARylation) by transferring ADP ribose units from nicotinamide (NAD⁺) onto diverse acceptor proteins [39]: this post-translational

modification is important in a wide array of physiological processes and in response to DNA damage [40–42].

We tested whether PARP-1 activity is compromised in CDA deficient cells. We assayed basal levels of PARylation by immunofluorescence microscopy and customized software for automatic counting of PAR foci. At least 500 cells per condition were counted for each experiment (S4A Fig and materials and methods). Basal PARylation levels were significantly lower in CDA-deficient HeLa and BS cells than in control cells (Fig 4A and S4C Fig). This was not due to a weaker PARP-1 expression in CDA-deficient cells (Fig 4B). There were twice as many cells without PAR foci and fewer cells with three or more foci in the absence than presence of CDA (S4B Fig). Therefore, basal PARP-1 activity is lower in the absence of CDA.

CPT treatment abolished the mitotic defects observed in CDA-deficient cells (Fig 2B and 2C), so we tested whether CPT treatment restored PARP-1 activity. CPT treatment activated PARP-1 in both CDA-deficient cells and control cells (Fig 4C and S4C Fig). The frequency of PAR foci (Fig 4C and 4D and S4C Fig) and numbers of UFBs (Fig 2B and Fig 2C) in CPT-treated CDA-deficient cells were similar to those in untreated control cells. We treated cells with H₂O₂, another PARP-1 activator [43]. The treatment of CDA-depleted cells with H₂O₂ increased PARylation (S4D Fig), and normalized the UFB frequency (Fig 4E). We assessed the dependence on PARP-1 activity of the suppressor effect of CPT, using the PARP-1 inhibitor olaparib [44]. Olaparib treatment (S4E Fig) reduced the frequency of PAR foci in both CDA-proficient and CDA-deficient cells, and abolished the effect of CPT on PARylation levels without changing CDA or PARP-1 levels (S4F and S4G Fig). Olaparib treatment also increased UFB frequency in CDA-expressing cells, but not in CDA-deficient cells (Fig 4F and S4H Fig). As expected, CPT treatment did not prevent supernumerary UFB formation in CDA-deficient cells treated with olaparib to inhibit PARP-1 (Fig 4G and S4H Fig).

These experiments show how CPT treatment alleviates the mitotic defects observed in the absence of CDA. There is a deficiency in the basal PARP-1 activity in CDA-deficient cells, and CPT treatment restores PARP-1 activity to levels similar to those in untreated control cells, rescuing the mitotic defects.

To further confirm these data, we used HeLa cells stably depleted of PARP-1 with a specific shRNA (HeLa-shPARP-1) [45, 46]. We checked that BLM and CDA levels were unaffected in these cells (Fig 4H). PARP-1-depleted cells displayed higher than control frequencies of unreplicated centromeres, metaphase cells presenting EdU foci, and UFBs, thereby mimicking CDA deficiency (Fig 4I–4K). As expected, these increases were not abolished by CPT treatment (S4I and S4J Fig).

Thus, regardless of how PAR synthesis was suppressed, through the inhibition or depletion of PARP-1, we observed an increase in the frequencies of unreplicated centromeres, EdU focus formation and UFBs. Moreover, these results also indicate that the effect of CPT in the prevention of excess UFB formation is strictly dependent on PARP-1 activity, with no additive effects of CDA deficiency and PARP-1 inhibition. CDA and PARP-1 must, therefore, act in the same pathway to prevent UFB formation. These results indicate that optimal PARP-1 activity is required for full centromere replication, which in turn prevents abnormal DNA synthesis and UFB formation during mitosis.

CDA deficiency leads to a slowing of the replication fork [25]. Decreases in PARP-1 activity due to CDA deficiency compromise the completion of DNA replication and lead to UFB formation. We therefore investigated whether PARP-1 depletion affected replication fork speed: PARP-1 depletion accelerated fork progression (S4K Fig), whereas CDA-deficiency slowed replication (S1H Fig). Thus, the completion of DNA replication, which prevents the formation of UFB-containing unreplicated DNA, is not directly related to the overall rate of fork progression.

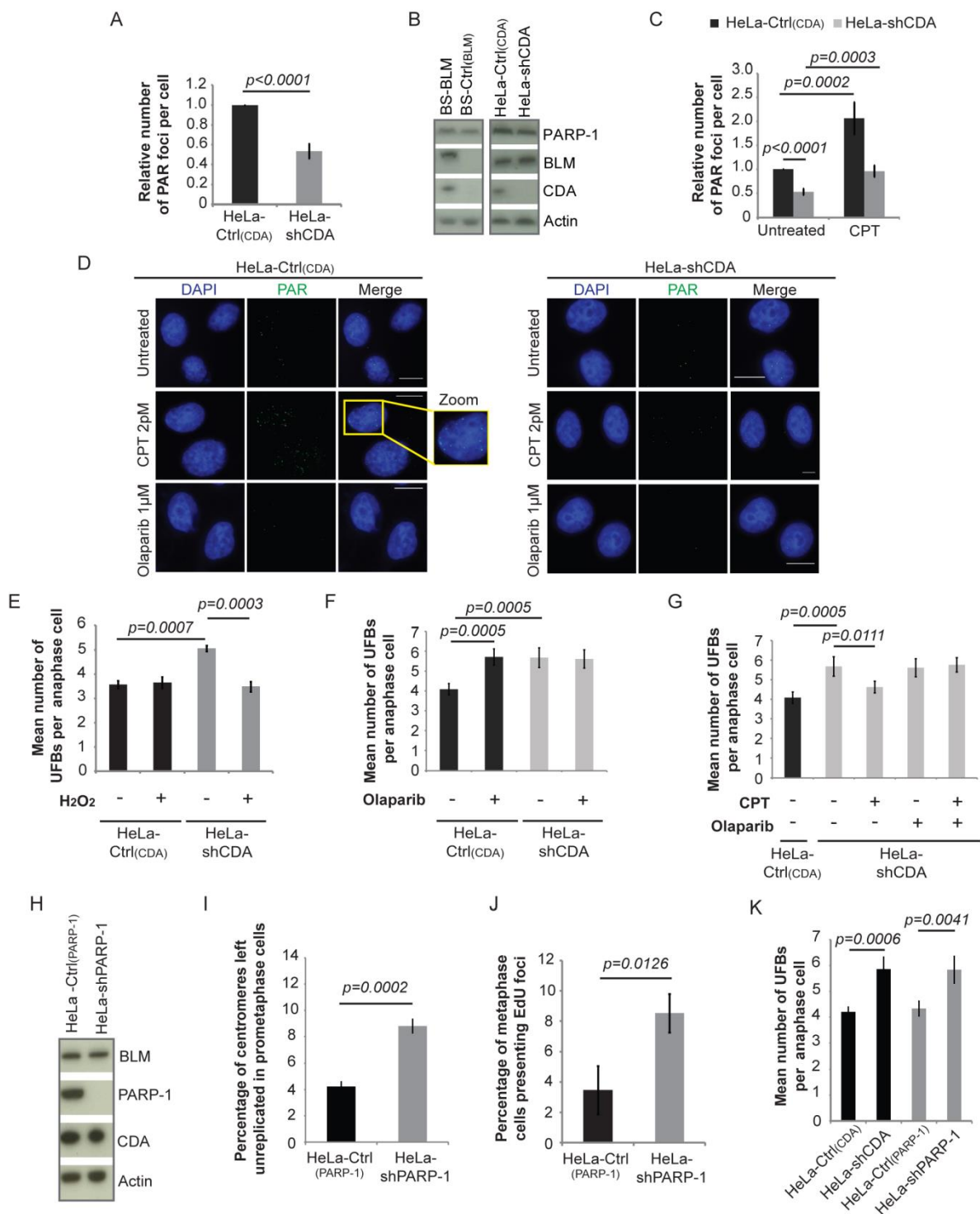


Fig 4. CDA deficiency is associated with a decrease in basal PARP-1 activity, leading to incomplete replication of DNA, promoting UFB formation. (A) Relative number of PAR foci in HeLa-Ctrl_(CDA) (black bar) and HeLa-shCDA (gray bar) cell lines. Error bars represent means \pm SD from three independent experiments (> 680 cells per condition). (B) Abundance of PARP-1, BLM and CDA proteins, assessed by immunoblotting, in the indicated cell lines. (C) Relative number of PAR foci in HeLa-Ctrl_(CDA) (black bars) and HeLa-shCDA (gray bars) cells left untreated or treated with 2 pM CPT. Error bars represent means \pm SD from five experiments (> 530 cells per condition). (D) Representative immunofluorescence images of HeLa-Ctrl_(CDA) (left panel) and HeLa-shCDA (right panel) interphase cells. Nuclei were visualized by DAPI staining (blue). PAR foci were stained with PAR antibody (in green). Boxed regions are enlarged. Scale bar: 5 μ m. (E) Mean number of UFBs per anaphase cell, for HeLa-Ctrl_(CDA) (black bars) and HeLa-shCDA (gray bars) cell lines treated with 30 μ M H₂O₂ (according to the same protocol as for CPT treatment, Fig 3A). Error bars represent means \pm SD from three independent experiments (> 90 anaphase cells per condition). (F) Mean number of UFBs per anaphase cell, for the HeLa-Ctrl_(CDA) (black bars) and HeLa-shCDA (gray bars) cell lines left untreated or treated with 1 μ M olaparib. Error bars represent means \pm SD from five independent experiments (> 120 anaphase cells per condition). (G) Mean number of UFBs per anaphase cell, for the HeLa-Ctrl_(CDA) (black bars) and HeLa-shCDA (gray bars) cell lines left untreated or treated with 2pM CPT and/or 1 μ M olaparib. Error bars represent means \pm SD from five independent experiments (> 120 anaphase cells per condition). (H) Amounts of BLM, PARP-1, and CDA, assessed by immunoblotting, in the indicated cell lines. (I) Percentage of centromeres left unreplicated in HeLa-Ctrl_(PARP-1) (black bar) and HeLa-shPARP-1 (gray bar) prometaphase cells. Error bars represent means \pm SD from three independent experiments (> 105 metaphase cells per condition). (J) Percentage of metaphase cells presenting EdU foci in HeLa-Ctrl_(PARP-1) (black bar) and HeLa-shPARP-1 (gray bar) cell lines. Error bars represent means \pm SD for three independent experiments (> 115 metaphase cells were analyzed). (K) Mean number of UFBs per anaphase cell in the indicated cell lines. Error bars represent means \pm SD from four independent experiments (> 105 anaphase cells per condition). Statistical significance was calculated with Student's *t*-test.

doi:10.1371/journal.pgen.1005384.g004

CDA deficiency leads to excess dCTP, lowering PARP-1 activity and promoting UFB formation

Our results indicated that long-term dU supplementation rescued the excess of UFBs (Fig 1E and S1J Fig), suggesting a possible influence of dUTP pool on PARP-1 activity. We therefore investigated whether CDA deficiency was associated with lower levels of cellular dUTP, as expected [27]. We detected no decrease in cellular dUTP levels in the absence of CDA (S5A Fig), suggesting that dU supplementation did not act by restoring the dUTP pool. These results prompted us to check whether culturing CDA-deficient cells in the presence of dU decreased UFB frequency through PARP-1 activation, rather than by mimicking CDA activity, as previously proposed [25]. We found that long-term dU treatment significantly increased the PAR signal (S5B Fig), indicating that the decrease in UFB frequency observed in dU-treated CDA-depleted cells was probably due to PARP-1 activation. These results suggest that the rescue by dU treatment involves a cellular metabolic process creating DNA lesions, similarly to CPT treatment. Indeed, we suggest that the addition of dU led to dUTP incorporation into DNA, activating the base excision repair pathway, and, thus, PARP-1, to ensure that dUTP is removed from the DNA [47, 48]. We conclude that the lower basal PARP-1 activity in CDA-deficient cells is probably not related to the dUTP pool, because it is unaffected in these cells.

We then investigated whether excess dCTP impaired PARP-1 activity, because dCTP accumulation is an established consequence of CDA deficiency (S1G Fig). The addition of dC to the culture medium decreased PARylation levels by 23% in CDA-expressing HeLa cells, and 18% in BS-BLM cells. Moreover, dC treatment during S phase (S5C Fig) increased UFB frequencies in these cells to levels similar to those in the corresponding CDA-deficient cells (Fig 5A and 5B and S5D and S5E Fig). The addition of dC did not affect PARylation levels or UFB frequency in CDA-deficient cells (Fig 5A and 5B and S5D and S5E Fig). The presence of dC also significantly increased the frequency of unreplicated centromeres in CDA-expressing HeLa cells (Fig 5C and S5F Fig).

These unexpected results led us to check whether the partial cellular inhibition of PARP-1 by dC treatment, which is known to induce dCTP accumulation [25], reflected PARP-1 inhibition by dCTP. We used an *in vitro* colorimetric PARP assay kit (Trevigen), with 3-aminobenzamide (3-AB) as a control PARP-1 inhibitor. The inhibition of PARP-1 activity by dCTP was dose-dependent, and was 95% at 10 mM dCTP (Fig 5D and 5E). Interestingly, 10 mM dATP, dGTP, dTTP or dUTP had no effect on PARP-1 activity (Fig 5E), indicating that the only dNTP to inhibit PARP-1 *in vitro* is dCTP. This inhibition was fully reversed by the addition of

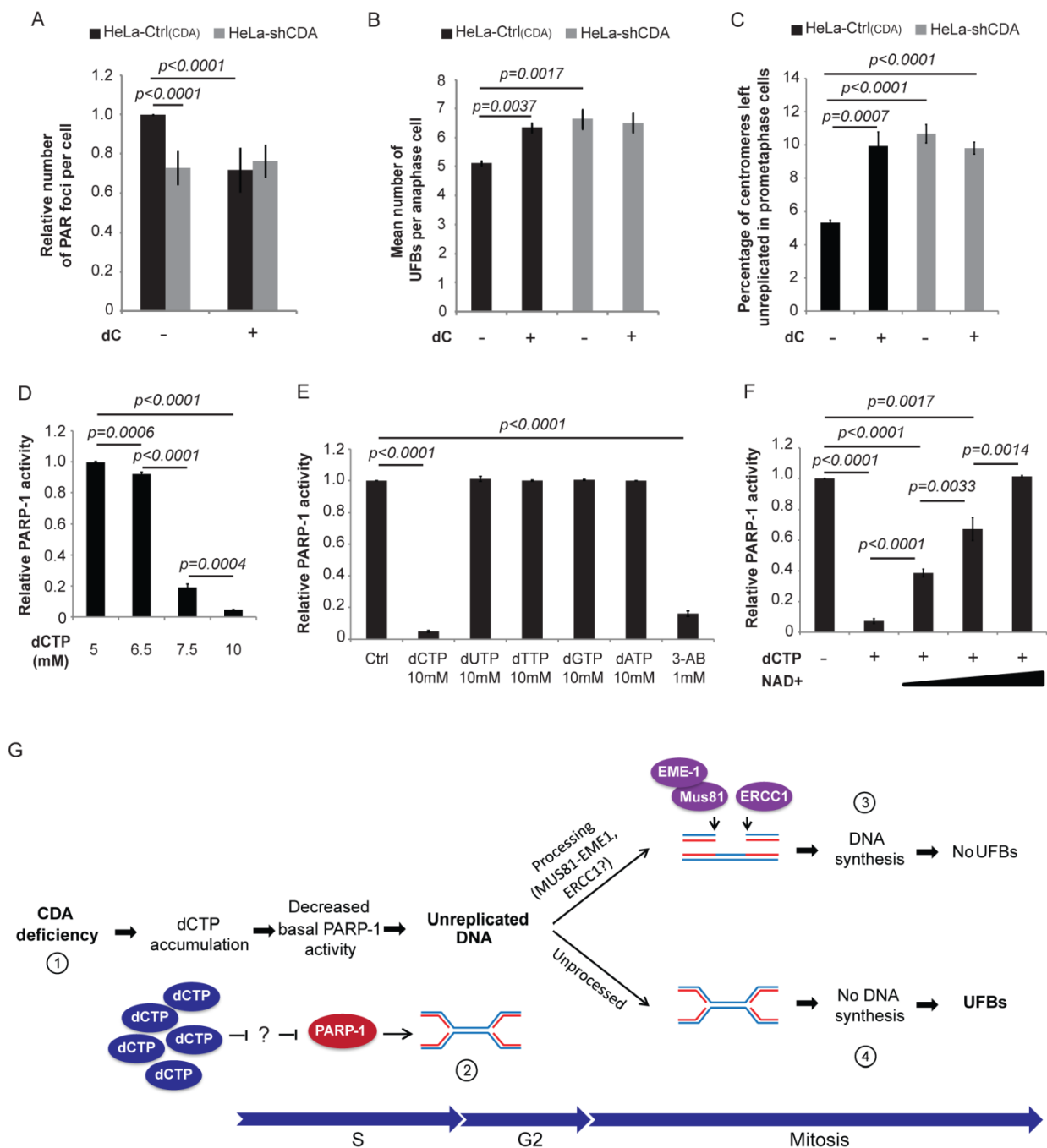


Fig 5. CDA deficiency leads to excess dCTP, inhibiting PARP-1 activity and leading to UFB formation. (A) Relative number of PAR foci in HeLa-Ctrl(CDA) (black bars) and HeLa-shCDA (gray bars) cell lines treated with 1 mM dC. Error bars represent means \pm SD for five independent experiments ($> 1,200$ cells per condition). (B) Mean number of UFBs per anaphase cell in HeLa-Ctrl(CDA) (black bars) and HeLa-shCDA (gray bars) cell lines left untreated or treated with 1 mM dC. Error bars represent means \pm SD for three independent experiments (> 95 anaphase cells per condition). (C) Percentage of centromeres left unreplicated in HeLa-Ctrl(CDA) (black bars) and in HeLa-shCDA (gray bars) prometaphase cells left untreated or treated with 1 mM dC. Error bars represent means \pm SD for three independent experiments (> 95 anaphase cells per condition). (D) *In vitro* analysis of PARP-1 activity in the presence of

various amounts of dCTP. Error bars represent means \pm SD from three independent experiments. Statistical significance was calculated with Student's *t*-test. (E) *In vitro* analysis of PARP-1 activity in the presence of 1 mM 3-AB or 10 mM dCTP, dUTP, dTTP, dGTP, dATP. Error bars represent means \pm SD from three independent experiments. (F) *In vitro* analysis of PARP-1 activity in the presence of 10 mM dCTP and various amounts of biotinylated NAD⁺ (20; 50; 100 μ M). Error bars represent means \pm SD from three independent experiments. Statistical significance was calculated with Student's *t*-test. (G) (1) CDA deficiency leads to intracellular dCTP accumulation, decreasing basal PARP-1 activity. (2) The decrease in basal PARP-1 activity leads to an increase in unreplicated DNA sequences (preferentially at centromeres and CFS sites). (3) During late G2/early mitosis, some of this unreplicated DNA is probably processed by MUS81-EME1 and ERCC1 nucleases as previously suggested [36, 12], leading to DNA synthesis during metaphase (EdU foci) and preventing supernumerary UFB formation. (4) Some of the excess unreplicated DNA sequences are not processed by the nucleases, leading to supernumerary UFB formation.

doi:10.1371/journal.pgen.1005384.g005

100 μ M NAD⁺ (NAD⁺ is the PARP-1 substrate used as a donor of ADP-ribose units for PARylation reactions [28]) indicating that dCTP is a poor inhibitor of PARP-1 *in vitro* (Fig 5F). Therefore, PARP-1 inhibition by dCTP *in vivo* is unlikely in the presence of the concentrations of dCTP and NAD⁺ found in cells (see the [discussion](#)).

Nevertheless, these analyses demonstrate that increasing the amount of intracellular dCTP by culturing cells in the presence of dC is sufficient to reduce PARP-1 activity.

Discussion

We have discovered a novel mechanism by which the distortion of the cellular dNTP pool can affect genome stability. CDA deficiency, and thus excess dCTP, cause under-replication of some loci in the genome, leading to UFB formation. Unexpectedly, this incomplete DNA replication was found not to be due to the slowing of the replication fork induced by CDA deficiency. We show that the under-replication of “difficult-to-replicate” sites is a consequence of partial inhibition of the basal activity of PARP-1, likely due to the intracellular accumulation of dCTP. These findings reveal, unexpectedly, that PARP-1 is required for robust DNA replication and thus the avoidance of unreplicated DNA-associated UFBs. This work has broader implications for pathological situations associating higher replication stress and cancer susceptibility, such as Bloom syndrome.

Excessive UFB formation in BS cells is a consequence of CDA deficiency and not BLM deficiency

We previously showed that CDA deficiency slows the progression of the replication fork and contributes to the high levels of SCEs in BS cells [25]. We report here that supernumerary UFBs in BS cells are entirely and solely due to CDA deficiency. In contrast, high chromatin bridge frequency results directly from BLM deficiency, and not from CDA deficiency. Our study demonstrates that these two types of sister-chromatid bridges have distinct genetic causes and presumably therefore different origins. This conclusion contrasts with a previous report suggesting that UFBs are derived from chromatin bridges through chromatin unraveling by PICH and BLM [49]. We also show that CDA deficiency makes a major contribution to several aspects of the cellular phenotype associated with Bloom syndrome. In view of this, all observations relating to or following BLM depletion should be interpreted with care: BLM depletion leads to CDA depletion [25, 26], and some of the cellular abnormalities observed may result from nucleotide pool disequilibrium associated with CDA deficiency, rather than BLM depletion *per se*.

UFB-containing unreplicated DNA results from low basal PARP-1 activity and is not related to the rate of fork progression

The precise nature and structure of UFBs remains to be established. Our data indicate that both centromeric and CFS-associated UFBs likely contain unreplicated DNA, suggesting that,

like CFS-associated UFBs, centromeric UFBs originate from unresolved replication intermediates. The frequency of mitotic DNA synthesis foci that co-localize with centromeres and CFS was abnormally high in CDA-deficient cells. The nature of these DNA synthesis events is still unclear, but these observations are consistent with centromeres and CFS being late-replicated loci in the absence of CDA, the duplication of which may be completed into mitosis. The persistence of mitotic DNA synthesis may allow the completion of DNA replication/repair of sites that were not fully replicated by the end of S phase; however, it is possible that only few sites are able to benefit from this mitotic processing [36, 12], such that many remain unreplicated, leading to UFB formation (Fig 5G). In support of this, the duplication of centromeres was impaired in the absence of CDA when cells enter mitosis.

CDA deficiency caused a lowering of basal PARP-1 activity. The reactivation of PARP-1 activity by exposing cells to genotoxic agents that activate PARP-1 was sufficient to restore the completion of DNA replication and suppress the formation of supernumerary UFBs. In addition, both depletion and chemical inhibition of PARP-1 resulted in partially replicated centromeres and under-replication-induced UFBs. These findings reveal a previously unsuspected role for PARP-1 in contributing to the robustness of DNA replication and preventing abnormal segregation of unreplicated DNA.

In contrast to CDA deficiency, stable down-regulation of PARP-1 accelerated replication fork progression. In previous studies, transient or chemical inhibition of PARP-1 did not affect replication fork speed [33, 50]. Similarly, while PARP-1 inhibition was reported to limit fork reversal upon genotoxic stress [33, 34, 51], the partial reduction in PARP-1 activity reported here in CDA-defective cells was associated with an increase in the rate of fork reversal, probably due to the observed increase in the frequency of discontinuities on the replication template [32]. The reasons for these discrepancies are unclear but could be related to the way PARP-1 activity was inhibited. Nonetheless, the completion of DNA replication, which prevents the formation of UFB-containing unreplicated DNA, is not directly related to the rate of fork progression.

Our analyses show that the deleterious effects of nucleotide pool disequilibrium on genome stability extend further than previously anticipated, and include inhibition of PARP-1 activity. PARP-1 defects may therefore be a source of endogenous replication stress. A decrease in basal PARP-1 activity of about 30% led to the formation of a number of supernumerary UFBs similar to that observed following total PARP-1 inhibition or depletion. This suggests that there is a critical basal threshold of PARP-1 activity for full replication of the genome before the cells enter mitosis. Although PARP-1 promoted the recovery of stalled replication forks through homologous recombination (HR) [52] inhibition of RAD51, and thereby of HR does not affect UFB frequency [15, 16]. Therefore, PARP-1 may also contribute to the completion of replication at AT-rich DNA sequences through a mechanism independent of HR.

Thousands of proteins, involved in diverse biological functions, are substrates of PARP-1 [39]. Most PARP-1 targets have been identified on the basis of responses to genotoxic stresses and basal PARylation levels of specific targets are difficult to determine [39]. In the absence of CDA, exposure of cells to genotoxic stress restored the activation of PARP-1 masking abnormal PARylation of individual substrates. Thus, further work is required to identify PARP-1 substrates that prevent UFB formation.

The intracellular accumulation of dCTP inhibits PARP-1 activity

CDA deficiency leads to an excess dCTP. We report that increasing the intracellular dCTP pool *in vivo* by culturing cells in the presence of dC was sufficient to reduce PARP-1 activity, leading to the under-replication-induced formation of UFBs. We also showed that dCTP was

the only dNTP that inhibited PARP-1 activity, although this inhibition was observed only at high dCTP concentrations (between 6.5 and 10 mM) and was fully reversed by 100 μ M NAD⁺. The physiological intracellular concentrations of dCTP and NAD⁺ have been estimated to be about 30 μ M and 1 mM, respectively [53, 54], and CDA-deficient cells contain about twice as much dCTP as control cells [25] (S1G Fig). As 100 μ M NAD⁺ is sufficient to reverse the PARP-1 inhibition induced by 10 mM dCTP *in vitro*, it is unlikely that dCTP compete with NAD⁺ *in vivo*, to inhibit PARP-1. However, we cannot formally exclude the possibility that a particular environment within cells influences the local NAD⁺/dCTP ratio during replication, making it possible for dCTP to inhibit PARP-1 directly. The analysis of local concentrations of nucleotides at sites of DNA replication or repair remains difficult and this issue has been little explored, but such analyses in the future would undoubtedly shed light on new mechanisms.

In conclusion, our findings indicate that in CDA-deficient cells, the presence of excess intracellular dCTP caused a lowering of basal PARP-1 activity, impeding replication at some chromosomal loci, including centromeres and CFS, on entry into mitosis. Unreplicated DNA that is not processed by mitotic DNA synthesis results in the formation of supernumerary UFBs (Fig 5G).

Materials and Methods

Detailed materials and methods are provided in *supporting information* (S1 Materials and Methods).

Cell culture and treatments

Cell lines were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS. BS-Ctrl_(BLM), BS-BLM cells, BS-Ctrl_(CDA) and BS-CDA were obtained and cultured as previously described [25].

The BS-BLM-CDA cell line was obtained by transfecting BS-BLM cells with a vector containing the full-length CDA cDNA (NM001785), with JetPEI reagent. After 48 h, selection was carried out with 0.2 μ g.ml⁻¹ puromycin (Invivogen) and 500 μ g.ml⁻¹ G418 (Euromedex). Individual colonies were isolated and maintained in culture with 0.1 μ g.ml⁻¹ puromycin and 500 μ g.ml⁻¹ G418.

HeLa-Ctrl_(CDA) and HeLa-shCDA cells were obtained by transfecting cells with an empty pGIPZ vector or with the same vector encoding a short hairpin RNA sequence directed against CDA (Open Biosystems, clone V3LHS_369299), respectively, with JetPEI reagent. After 48 h, transfectants were selected on 1–5 μ g.ml⁻¹ puromycin (Invivogen). Individual colonies were isolated and cultured in medium containing 1 μ g.ml⁻¹ puromycin.

HeLa-Ctrl_(PARP-1) and HeLa-shPARP-1 cells were cultured as previously described [46].

For siRNA transfection assays, 3×10⁵ HeLa cells or 8×10⁵ BS-Ctrl_(BLM), BS-BLM, BS-Ctrl_(CDA), BS-CDA, or BS-BLM-CDA cells were used to seed the wells of a six-well plate. Cells were transfected with an siRNA specific for BLM or CDA (ON-TARGETplus SMART-pool, Dharmacon) or negative control siRNAs (ON-TARGETplus siCONTROL Non Targeting Pool, Dharmacon; 100 nM final concentration) for 48 h for BLM, or twice successively, for a total of 120 h for CDA, in the presence of DharmaFECT 1 (Dharmacon).

Deoxyuridine (dU), deoxycytidine (dC), deoxyuridine triphosphate (dUTP), deoxycytidine triphosphate (dCTP), deoxyadenosine triphosphate (dATP), deoxyguanosine triphosphate (dGTP) and thymidine triphosphate (dTTP) were provided by Sigma Aldrich (D5412; D0779; D4001, D4635, D6500, D4010 and T0251 respectively); tetrahydrouridine (THU) was provided by Calbiochem (584222); camptothecin (CPT) was provided by Sigma Aldrich (C9911) and olaparib was provided by SelleckChem (S1060). THU and dU were added to the cell culture medium at a final concentration of 100 μ M, for 96 h (2x48 h). Other drugs were added to the

cell culture medium at the following concentrations: dC, 1 mM; H₂O₂, 30 μM; camptothecin, 2 pM; olaparib, 1 μM.

All cells were routinely checked for mycoplasma infection.

Western blot analysis and antibodies

Cells were lysed in 8 M urea, 50 mM Tris HCl, pH 7.5 and 150 mM β-mercaptoethanol, sonicated and heated at 75°C for 10 minutes. Samples (equivalent of 2 × 10⁵ cells) were subjected to electrophoresis in NuPAGE Novex 4–12% Bis-Tris pre-cast gels (Life Technologies). The procedures used for gel electrophoresis and immunoblotting have been described elsewhere [16]. Primary and secondary antibodies were used at the following concentrations: rabbit anti-BLM antibody (1:5,000; ab2179 from Abcam); rabbit anti-CDA antibody (1:500; ab56053 from Abcam); rabbit anti-β-actin antibody (1:10,000; Sigma); rabbit anti-PARP-1 antibody (1:4,000; ALX-210-302 from Enzo Life Sciences); rabbit anti-Chk2 (1/500; 2662 from Cell Signaling; rabbit anti-Chk2 T68 (1/500; 2661 from Cell Signaling; rabbit anti-H2AX (1/500; 2595 from Cell Signaling); rabbit anti-H2AX S139 (1/500; 2577 from Cell Signaling); horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:5,000; Santa Cruz Biotechnology).

Immunofluorescence microscopy

Immunofluorescence staining and analysis were performed as previously described [17]. Details of the protocol are provided in *SI Appendix, SI Materials and Methods*.

Statistical analysis

At least three independent experiments were carried out to generate each dataset and the statistical significance of differences was calculated with Student's *t*-test, Kruskal-Wallis tests or Mann and Whitney tests, as indicated in the figure legends. We distinguished true colocalization from the random colocalization of EdU foci and CREST or FANCD2 foci, by analyzing the images with the Image J macro "confined displacement algorithm" [37].

Supporting Information

S1 Fig. CDA prevents supernumerary UFB formation. (A) Mean number of UFBs per anaphase cell in the BS-Ctrl_(BLM), BS-BLM, BS-Ctrl_(CDA), and BS-CDA cell lines and the respective proportions of these UFBs associated with CREST (black bars, left panel) or FANCD2 (black bars, right panel). Error bars represent means ± SD from four independent experiments (> 120 anaphase cells per condition). (B-C) Percentages of anaphase cells presenting 0, 1, 2 or 3 or more UFBs in (B) BS-Ctrl_(BLM) and BS-BLM cell lines and in (C) BS-Ctrl_(CDA), and BS-CDA cell lines. Data are from five independent experiments (> 170 anaphase cells per condition). (D) Mean number of UFBs (black bars) and chromatin bridges (gray bars) per anaphase cell in BS-Ctrl_(CDA), BS-BLM-Ctrl and BS-BLM-CDA cell lines (left panel); BLM and CDA levels, assessed by immunoblotting (right panel). Errors bars represent means ± SD from three independent experiments (> 120 anaphase cells per condition (UFBs) or > 70 anaphase cells per condition (chromatin bridges)). (E) BLM and CDA levels, assessed by immunoblotting, in BS-Ctrl_(BLM) and BS-BLM cell lines left untreated or treated with 100 μM dU or 100 μM THU. (F) CDA protein and mRNA were assayed by immunoblotting and by reverse transcription-quantitative PCR, respectively, in HeLa-Ctrl_(CDA) and HeLa-shCDA cells. Error bars represent means ± SD from three independent experiments. (G) HPLC analysis of the relative concentrations of dC and dCTP in HeLa-shCDA cells and HeLa-Ctrl_(CDA) cells. Error bars represent means ± SD from two independent experiments. (H) DNA

combing analysis of replication fork velocity in HeLa-Ctrl_(CDA) (black bars) and HeLa-shCDA (gray bars) cells. Error bars represent the range of four independent experiments (> 1400 replication tracts). Mann-Whitney tests were used to compare total numbers of DNA-positive tracts from the four experiments. (I) SCE frequencies in HeLa-Ctrl_(CDA) (black bars) and HeLa-shCDA (gray bars) cell lines. Error bars represent means \pm SD from three independent experiments (> 1800 chromosomes analyzed for each condition). (J) Mean number of UFBs per anaphase cell in HeLa-Ctrl_(CDA) (black bars) and HeLa-shCDA (gray bars) cells left untreated or treated with 100 μ M deoxyuridine (dU) or 100 μ M tetrahydrouridine (THU). Statistical significance was calculated with Student's t-test.

(TIF)

S2 Fig. CDA deficiency does not promote global replication fork uncoupling but leads to the accumulation of ssDNA gaps at replication forks.

(A) BLM and CDA abundance assayed by immunoblotting, in HeLa-Ctrl_(CDA) and HeLa-shCDA cells left untreated or treated with 2pM CPT. (B) Cell cycle analysis of HeLa-Ctrl_(CDA) and HeLa-shCDA cells left untreated or treated with 2 pM CPT. (C) Representative EM images of replication forks in HeLa-Ctrl_(CDA) and HeLa-shCDA cells. Black arrows indicate ssDNA gaps in parental or replicated duplexes, and white arrows indicate ssDNA gaps at the forks. The insets show magnified parts of the molecules, displaying ssDNA regions. Scale bars: 500 bp and 200 bp in the insets. (D) Table summarizing the size of the gaps at replication forks in HeLa-Ctrl_(CDA) and HeLa-shCDA cell lines left untreated or treated with 2 pM CPT. (E) Statistical analysis of the size of the gaps at the forks in HeLa-Ctrl_(CDA) and HeLa-shCDA cells left untreated or treated with 2 pM CPT. Whiskers indicate the minimum and maximum values in Kruskal-Wallis tests. No significant difference was observed between the four series. (F) Percentage of replication forks with 1 (black bars) or more than 1 (gray bars) ssDNA gap in HeLa-Ctrl_(CDA) and HeLa-shCDA cells left untreated or treated with 2 pM CPT. (G) Chk2 T68 and H2AX S139 levels, assessed by immunoblotting, in HeLa-Ctrl_(CDA) and HeLa-shCDA cells (left panel) and quantification of band intensity for Chk2 T68 and H2AX S139 relative to total protein (right panel). (H) Percentage fork reversal in HeLa-Ctrl_(CDA) and HeLa-shCDA cells left untreated or treated with 2 pM CPT. At least 50 replication forks were analyzed to quantify the percentage of replication forks with ssDNA gaps and the percentage of fork reversal.

(TIF)

S3 Fig. CREST and FANCD2 associate with regions close to areas of mitotic DNA synthesis.

Representative immunofluorescence deconvoluted z-projection images of HeLa-Ctrl_(CDA) cells. DNA was visualized by DAPI staining (blue). EdU was stained with Alexa Fluor 555 (in magenta). Centromeres were stained with CREST serum (in green, upper panel) and CFS were stained by FANCD2 antibody (in green, lower panel). Boxed images are enlarged; yellow arrows indicate EdU foci and white arrows indicate CREST or FANCD2 foci.

(TIF)

S4 Fig. Optimal PARP-1 activity is required for the full replication of centromeres and to prevent DNA synthesis and UFB formation during mitosis.

(A) The number of PAR foci in each nucleus was determined by a customized macro using a semi-automated procedure. Briefly, each acquisition corresponding to DAPI and PAR staining was opened (Step 1). A user defined intensity value (one value for all experiments) was applied as a threshold (Step 2). The nucleus stack was smoothed using a median filter (radius 5), and a mask generated. This mask was transferred onto the focus stack so that only foci in nuclei were analyzed (Step 3). A top-hat filter was applied to this result to eliminate the local background, and facilitate the segmentation process based on application of a user-defined threshold value. Finally, the macro

counted and characterized the foci (Step 4). At least 500 nuclei were analyzed for each condition. (B) Percentage of nuclei with various numbers of PAR foci in HeLa-Ctrl_(CDA) and HeLa-shCDA cells. Data are from three independent experiments (> 680 cells per condition). (C-D) Relative number of PAR foci in indicated cell lines left untreated or treated with 2 pM CPT (C) or with 30 μ M H₂O₂ (D). Error bars represent means \pm SD from (C) three independent experiments (a total of > 500 cells per condition) or (D) three independent experiments (> 360 cells per condition). (E) Schematic representation of 10 hours of treatment with 2 pM CPT and/or 1 μ M olaparib during the cell cycle; only cells treated during the S and G2 phases were analyzed in anaphase. (F) Immunoblot assays of PARP-1 and CDA in HeLa-Ctrl_(CDA) and HeLa-shCDA cells left untreated or treated with 2 pM CPT and/or 1 μ M olaparib. (G) Relative number of PAR foci in indicated cell lines left untreated or treated with 2 pM CPT and/or 1 μ M olaparib. Error bars represent means \pm SD from four independent experiments (> 500 cells per condition). (H) Mean number of UFBs per anaphase cell in BS-Ctrl_(BLM) (gray bars) and BS-BLM (black bars) cells left untreated or treated with 2pM CPT and/or 1 μ M olaparib. Error bars represent means \pm SD from three independent experiments (> 105 anaphase cells per condition). (I) Percentage of metaphase cells presenting EdU foci in HeLa-Ctrl_(PARP-1) (black bars) and HeLa-shPARP-1 (grey bars) cell lines treated with 2 pM CPT. Error bars represent means \pm SD from three independent experiments (> 105 metaphase cells per condition). (J) Mean number of UFBs per anaphase cell in HeLa-Ctrl_(PARP-1) (black bars) and HeLa-shPARP-1 (gray bars) cells left untreated or treated with 2 pM CPT. Error bars represent means \pm SD from three independent experiments (> 105 anaphase cells per condition). Statistical significance was calculated with Student's t-test. (K) DNA combing analysis of replication fork velocity in HeLa-Ctrl_(PARP-1) (black bar) and HeLa-shPARP-1 (gray bar) cells. Error bars represent the range of three independent experiments (>730 replication tracts). Mann-Whitney statistical tests were used to study the results of all DNA-positive tracts analyzed in the three experiments.

(TIF)

S5 Fig. CDA deficiency results in excess dCTP, inhibiting PARP-1 activity and leading to UFB formation. (A) HPLC analysis of the relative concentrations of dUTP in HeLa-shCDA cells and HeLa-Ctrl_(CDA) cells. Error bars represent means \pm SD from three independent experiments. (B) Relative number of PAR foci in HeLa-Ctrl_(CDA) (black bars) and HeLa-shCDA (gray bars) cell lines treated with 100 μ M dU (96h). Error bars represent means \pm SD for six independent experiments (> 850 cells per condition). (C) Schematic representation of dC treatment during the cell cycle; only cells treated during the S and G2 phases were analyzed in anaphase. (D) Relative number of PAR foci in BS-Ctrl_(BLM) (gray bars) and BS-BLM (black bars) cell lines left untreated or treated with 1 mM dC. Error bars represent means \pm SD from three independent experiments (> 580 cells per condition). (E) Mean number of UFBs per anaphase cell, for BS-Ctrl_(BLM) (gray bars) and BS-BLM (black bars) cell lines left untreated or treated with 1 mM dC. Error bars represent means \pm SD from three independent experiments (> 95 anaphase cells per condition). Student's t-test was used to calculate the statistical significance of differences. (F) Percentage of chromosome 8 centromeres left unreplicated in HeLa-Ctrl_(CDA) (black bars) and in HeLa-shCDA (gray bars) metaphase cells left untreated or treated with 1 mM dC. Error bars represent means \pm SD from three independent experiments (> 90 metaphase cells per condition). The statistical significance of differences was calculated with the Student's t-test.

(TIF)

S1 Materials and Methods. Detailed Materials and Methods.

(DOC)

Acknowledgments

We thank V. Schreiber, S. Vagner, J. Hall and V. Pennaneach for stimulating discussions. We thank V. Schreiber and JC Amé for providing us with anti-PAR antibodies and for advice about PAR detection. We thank the Center for Microscopy and Image Analysis of the University of Zurich for technical assistance with electron microscopy. We thank Linh-Chi Bui for technical assistance with HPLC experiments. We thank F. berger for assistance with statistical analysis and we acknowledge the assistance of the PICT-IBISA, Institut Curie, Orsay.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SG AA JD SL ML MAG. Performed the experiments: SG AA GBL ROD JD DSFB. Analyzed the data: SG AA GBL ROD JD SL ML MAG. Contributed reagents/materials/analysis tools: DSFB. Wrote the paper: MAG SL. Designed and made the figures: SG.

References

1. Hills S.A. & Diffley J.F. (2014) DNA replication and oncogene-induced replicative stress. *Curr Biol* 24, R435–444.
2. Lecona E. & Fernandez-Capetillo O. (2014) Replication stress and cancer: It takes two to tango. *Exp Cell Res* 329, 26–34.
3. Magdalou I., Lopez B.S., Pasero P. & Lambert S.A. (2014) The causes of replication stress and their consequences on genome stability and cell fate. *Semin Cell Dev Biol* 30, 154–164.
4. Mazouzi A., Velimezi G. & Loizou J.I. (2014) DNA replication stress: Causes, resolution and disease. *Exp Cell Res* 329, 85–93.
5. Le Tallec B. et al. (2014) Updating the mechanisms of common fragile site instability: how to reconcile the different views? *Cell Mol Life Sci* 71, 4489–4494.
6. Mankouri H.W., Huttner D. & Hickson I.D. (2013) How unfinished business from S-phase affects mitosis and beyond. *Embo J* 32, 2661–2671.
7. Lengauer C., Kinzler K.W. & Vogelstein B. (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643–649.
8. Baumann C., Korner R., Hofmann K. & Nigg E.A. (2007) PICH, a centromere-associated SNF2 family ATPase, is regulated by Plk1 and required for the spindle checkpoint. *Cell* 128, 101–114.
9. Chan K.L., North P.S. & Hickson I.D. (2007) BLM is required for faithful chromosome segregation and its localization defines a class of ultrafine anaphase bridges. *Embo J* 26, 3397–3409.
10. Chan K.L. & Hickson I.D. (2009) On the origins of ultra-fine anaphase bridges. *Cell Cycle* 8, 3065–3066.
11. Chan K.L., Palma-Pallag T., Ying S. & Hickson I.D. (2009) Replication stress induces sister-chromatid bridging at fragile site loci in mitosis. *Nat Cell Biol* 11, 753–760.
12. Ying S. et al. (2013) MUS81 promotes common fragile site expression. *Nat Cell Biol* 15, 1001–1007.
13. Naim V. & Rosselli F. (2009) The FANC pathway and BLM collaborate during mitosis to prevent micronucleation and chromosome abnormalities. *Nat Cell Biol* 11, 761–768.
14. Naim V. & Rosselli F. (2009) The FANC pathway and mitosis: a replication legacy. *Cell Cycle* 8, 2907–2911.
15. Germann S.M. et al. (2013) TopBP1/Dpb11 binds DNA anaphase bridges to prevent genome instability. *J Cell Biol* 204, 45–59.
16. Lahkim Bennani-Belhaj K. et al. (2010) The Bloom syndrome protein limits the lethality associated with RAD51 deficiency. *Mol Cancer Res* 8, 385–394.
17. Rouzeau S. et al. (2012) Bloom's syndrome and PICH helicases cooperate with topoisomerase IIalpha in centromere disjunction before anaphase. *PLoS One* 7, e33905.
18. Debatisse M., Le Tallec B., Letessier A., Dutrillaux B. & Brison O. (2012) Common fragile sites: mechanisms of instability revisited. *Trends Genet* 28, 22–32.
19. Letessier A. et al. (2011) Cell-type-specific replication initiation programs set fragility of the FRA3B fragile site. *Nature* 470, 120–123.

20. German J. (1997) Bloom's syndrome. XX. The first 100 cancers. *Cancer Genet Cytogenet* 93, 100–106.
21. Ellis N.A. et al. (1995) The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell* 83, 655–666.
22. Bartram C.R., Koske-Westphal T. & Passarge E. (1976) Chromatid exchanges in ataxia telangiectasia, Bloom syndrome, Werner syndrome, and xeroderma pigmentosum. *Ann Hum Genet* 40, 79–86.
23. Chan K.L. & Hickson I.D. (2011) New insights into the formation and resolution of ultra-fine anaphase bridges. *Semin Cell Dev Biol* 22, 906–912.
24. Rao V.A. et al. (2007) Endogenous gamma-H2AX-ATM-Chk2 checkpoint activation in Bloom's syndrome helicase deficient cells is related to DNA replication arrested forks. *Mol Cancer Res* 5, 713–724.
25. Chabosseau P. et al. (2011) Pyrimidine pool imbalance induced by BLM helicase deficiency contributes to genetic instability in Bloom syndrome. *Nat Commun* 2, 368.
26. Nguyen G.H. et al. (2014) Regulation of gene expression by the BLM helicase correlates with the presence of G-quadruplex DNA motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
27. Nygaard P. (1986) On the role of cytidine deaminase in cellular metabolism. *Adv Exp Med Biol* 195 Pt B, 415–420.
28. Tallis M., Morra R., Barkauskaite E. & Ahel I. (2013) Poly(ADP-ribosyl)ation in regulation of chromatin structure and the DNA damage response. *Chromosoma* 123, 79–90.
29. Stoller R.G., Myers C.E. & Chabner B.A. (1978) Analysis of cytidine deaminase and tetrahydrouridine interaction by use of ligand techniques. *Biochem Pharmacol* 27, 53–59.
30. Arlt M.F. & Glover T.W. (2010) Inhibition of topoisomerase I prevents chromosome breakage at common fragile sites. *DNA Repair (Amst)* 9, 678–689.
31. Hahn A.T., Jones J.T. & Meyer T. (2009) Quantitative analysis of cell cycle phase durations and PC12 differentiation using fluorescent biosensors. *Cell Cycle* 8, 1044–1052.
32. Neelsen K.J. et al. (2013) Deregulated origin licensing leads to chromosomal breaks by rereplication of a gapped DNA template. *Genes Dev* 27, 2537–2542.
33. Berti M. et al. (2013) Human RECQ1 promotes restart of replication forks reversed by DNA topoisomerase I inhibition. *Nat Struct Mol Biol* 20, 347–354.
34. Ray Chaudhuri A. et al. (2012) Topoisomerase I poisoning results in PARP-mediated replication fork reversal. *Nat Struct Mol Biol* 19, 417–423.
35. Bergoglio V. et al. (2013) DNA synthesis by Pol eta promotes fragile site stability by preventing under-replicated DNA in mitosis. *J Cell Biol* 201, 395–408.
36. Naim V., Wilhelm T., Debatisse M. & Rosselli F. (2013) ERCC1 and MUS81-EME1 promote sister chromatid separation by processing late replication intermediates at common fragile sites during mitosis. *Nat Cell Biol* 15, 1008–1015.
37. Ramirez O., Garcia A., Rojas R., Couve A. & Hartel S. (2010) Confined displacement algorithm determines true and random colocalization in fluorescence microscopy. *J Microsc* 239, 173–183.
38. Zhang Y.W. et al. (2011) Poly(ADP-ribose) polymerase and XPF-ERCC1 participate in distinct pathways for the repair of topoisomerase I-induced DNA damage in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 39, 3607–3620.
39. Jungmichel S. et al. (2013) Proteome-wide identification of poly(ADP-Ribosyl)ation targets in different genotoxic stress responses. *Mol Cell* 52, 272–285.
40. Altmeyer M. et al. (2013) The chromatin scaffold protein SAFB1 renders chromatin permissive for DNA damage signaling. *Mol Cell* 52, 206–220.
41. Burkle A. & Virag L. (2013) Poly(ADP-ribose): PARadigms and PARadoxes. *Mol Aspects Med* 34, 1046–1065.
42. Kraus W.L. & Hottiger M.O. (2013) PARP-1 and gene regulation: progress and puzzles. *Mol Aspects Med* 34, 1109–1123.
43. Boesten D.M. et al. (2013) Accelerated aging during chronic oxidative stress: a role for PARP-1. *Oxid Med Cell Longev* 2013, 680414.
44. Fong P.C. et al. (2009) Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med* 361, 123–134.
45. Biard D.S. (2007) Untangling the relationships between DNA repair pathways by silencing more than 20 DNA repair genes in human stable clones. *Nucleic Acids Res* 35, 3535–3550.
46. Godon C. et al. (2008) PARP inhibition versus PARP-1 silencing: different outcomes in terms of single-strand break repair and radiation susceptibility. *Nucleic Acids Res* 36, 4454–4464.

47. Ladner R.D. (2001) The role of dUTPase and uracil-DNA repair in cancer chemotherapy. *Curr Protein Pept Sci* 2, 361–370.
48. Olinski R., Jurgowiak M. & Zaremba T. (2010) Uracil in DNA—its biological significance. *Mutat Res* 705, 239–245.
49. Ke Y. et al. (2011) PICH and BLM limit histone association with anaphase centromeric DNA threads and promote their resolution. *Embo J* 30, 3309–3321.
50. Sugimura K., Takebayashi S., Taguchi H., Takeda S. & Okumura K. (2008) PARP-1 ensures regulation of replication fork progression by homologous recombination on damaged DNA. *J Cell Biol* 183, 1203–1212.
51. Zellweger R. et al. (2015) Rad51-mediated replication fork reversal is a global response to genotoxic treatments in human cells. *J Cell Biol* 208, 563–579.
52. Bryant H.E. et al. (2009) PARP is activated at stalled forks to mediate Mre11-dependent replication restart and recombination. *Embo J* 28, 2601–2615.
53. Lin S.J. & Guarente L. (2003) Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease. *Curr Opin Cell Biol* 15, 241–246.
54. Zhang X. & Mathews C.K. (1995) Natural DNA precursor pool asymmetry and base sequence context as determinants of replication fidelity. *J Biol Chem* 270, 8401–8404.

SUPPORTING INFORMATION

For

PYRIMIDINE POOL DISEQUILIBRIUM INDUCED BY A CYTIDINE DEAMINASE DEFICIENCY INHIBITS PARP-1 ACTIVITY, LEADING TO THE UNDER-REPLICATION OF DNA

1. SI Materials and Methods:

Immunofluorescence microscopy. Immunofluorescence staining and analysis were performed as previously described (1). The drugs indicated were included in cell culture media for 3 or 10 h. Primary and secondary antibodies were used at the following concentrations: rabbit anti-PICH antibody (1/150; H00054821-D01P from Abnova); mouse anti-PICH antibody (1/400; H00054821-M01 from Abnova); human anti-CREST antibody (1/100; 15-234-0001 from Antibodies Inc); rabbit anti-FANCD2 antibody (1/200; NB100-182 from Novus Biologicals); goat anti-rabbit Alexa Fluor 555 (1/500; A21429 from Life Technologies); goat anti-mouse Alexa Fluor 555 (1/500; A21050 from Life Technologies); goat anti-rabbit Alexa Fluor 633 (1/500; A21070 from Life Technologies); goat anti-human Alexa Fluor 633 (1/500; A21091 from Life Technologies). Cell images were acquired with a 3-D deconvolution imaging system consisting of a Leica DM RXA microscope equipped with a piezoelectric translator (PIFOC; PI) placed at the base of a 63x PlanApo N.A. 1.4 objective, and a CoolSNAP HQ interline CCD camera (Photometrics). Stacks of conventional fluorescence images were collected automatically at a Z-distance of 0.2 mm (Metamorph software; Molecular Devices). Images are presented as maximum intensity projections, generated with ImageJ software, from stacks deconvolved with an extension of Metamorph software (2).

Poly(ADP)-ribose immunofluorescence. We used 4×10^5 HeLa cells or 8×10^5 BS-Ctrl_(BLM) or BS-BLM cells to seed the wells of a six-well plate. The cells were left untreated or were treated for 20 minutes with CPT, olaparib or H₂O₂, or for 1 h with dC. They were then washed in cold PBS on ice and fixed by incubation in a 1:1 (vol/vol) mixture of methanol and acetone for 10 minutes on ice. After three washes in PBS-Tween (0.05%), cells were incubated overnight at 4°C with a mouse anti-PAR antibody (1/500; generously provided by Valérie Schreiber (3)). The cells were washed three times with PBS-Tween (0.05%) and incubated with a goat anti-mouse Alexa Fluor 555-conjugated antibody (1/500; A21050 from Life Technologies) for 2 h. After two washes in PBS-Tween (0.05%), cells were mounted on slides with Prolong Gold with DAPI (P36931 from Life Technologies). Cell images were acquired with a 3-D deconvolution imaging system consisting of a Leica DM RXA microscope equipped with a piezoelectric translator (PIFOC; PI) placed at the base of a 63x PlanApo

N.A. 1.4 objective, and a CoolSNAP HQ interline CCD camera (Photometrics). Stacks of conventional fluorescence images were collected automatically at a Z-distance of 0.2 mm (Metamorph software; Molecular Devices). Images are presented as maximum intensity projections, generated with ImageJ software, from stacks deconvolved with an extension of Metamorph software (2). PAR foci per nucleus were counted by a customized macro using a semi-automated procedure, as follows: the nucleus stack was first smoothed using a median filter (radius 5), the user defined an intensity value as a threshold (one value for all experiments); a mask was then generated and transferred onto the stack of foci so that only foci in nuclei were analyzed. A top-hat filter was applied to the result to eliminate local background and facilitate the segmentation process, based on a simple threshold (user defined value). Finally, the macro counted and characterized foci. At least 500 nuclei were analyzed for each condition.

FISH Analysis. FISH was performed with the CEP-8 probe (Cen-8) from Abbott Vysis according to the manufacturer's instructions and as previously described (1).

HPLC analysis. We separated and quantified dC and dCTP as previously described (4, 5). Protein was extracted by incubation with 6% TCA and centrifugation for 5 minutes (12000 x g), and the resulting supernatants were neutralized with 2 M K₂CO₃. The samples were then treated on Strata X solid-phase extraction (SPE) cartridges, according to the manufacturer's instructions (Phenomenex). The resulting eluate was then injected, the same day, into the HPLC system (Shimadzu HPLC system interfaced with LabSolution software). Samples were injected onto a 250 x 4.1 mm PRP-1 column (Hamilton) and separated with buffer A for 8 min, followed by a linear gradient of buffer B from 0 to 75% over 62 minutes in buffer A, at a flow rate of 1 ml/min. Buffer A was 20 mM triethylammonium hydrogen carbonate and buffer B was 20 mM triethylammonium hydrogen carbonate in 20% methanol. A diode array detector (PDA) was used for detection. The LC Solution workstation chromatography manager was used to pilot the HPLC instrument and to process the data. The products were monitored spectrophotometrically at 254 and 260 nm and quantified by integration of the peak absorbance area, with a calibration curve established with various known concentrations of dC and dCTP.

Electron microscopy analysis of genomic DNA in mammalian cells. *In vivo* psoralen cross-linking, the isolation of total genomic DNA, enrichment in replication intermediates and their EM visualization were carried out as previously described (6, 7). Briefly, cells were harvested, and genomic DNA was crosslinked *in situ* by two rounds of incubation in 10 µM 4,5',8-trimethylpsoralen and two minutes of irradiation with UV light at a wavelength of 366 nm. Cells were lysed and genomic DNA was isolated from the nuclei by proteinase K digestion and phenol-chloroform extraction. The purified DNA was digested with *Pvu*II and enriched in replication intermediates by passage through a BND cellulose column. EM samples were prepared by spreading the DNA onto carbon-coated grids, and visualized

by platinum rotary shadowing. Images were acquired with a Philips CM 100 microscope. The lengths of *gaps* were estimate by comparison to a plasmid reference: the plasmid was 8240 bp and measured 3530 nm when evaluated by ImageJ on a .dm3 image (Gatan Digital Micrograph software); thus, 8240 bp corresponded to 3530 nm, and consequently 1 nm = 2.3 bp.

RT-qPCR. RT-qPCR analysis was performed as previously described (8). Briefly, total RNA was extracted with the RNeasy Mini kit (Qiagen), and subjected to a DNase digestion step. The A_{260}/A_{280} ratio was measured and the integrity of the RNA was assessed by gel electrophoresis. We synthesized cDNAs with 250 ng of random hexamers (Life Technologies), 2 µg of RNA and the GoScript reverse transcriptase (Promega). Quantitative PCR experiments were performed in accordance with MIQE Guidelines. Amplification mixtures contained the cDNA template (1/100 dilution), 1 × SYBR Green Supermix (BioRad) and 300 nM forward and reverse primers. Amplification was performed with the CFX96 detection system (BioRad). The relative values for CDA cDNA were normalized against those for two reference genes (*RPL32* and *HMBS*) chosen on the basis of their low M-values. The primer sequences for *RPL32* and *HMBS* have been described elsewhere (8). The sequences of the CDA primers used were: primer 1 (5'-CCCCTACAGTCACTTTCCTG-3') and primer 2 (5'-CGGGTAGCAGGCATTTTCTA-3').

EdU staining. EdU incorporation into DNA was visualized with the Click-it EdU imaging kit (C10338 from Life Technologies), according to the manufacturer's instructions. EdU was used at a concentration of 10 µM for the indicated time. Cells were incubated with the Click-it reaction cocktail for 15 minutes. Cell images were acquired with a 3-D deconvolution imaging system consisting of a Leica DM RXA microscope equipped with a piezoelectric translator (PIFOC; PI) placed at the base of a 63x PlanApo N.A. 1.4 objective, and a CoolSNAP HQ interline CCD camera (Photometrics). Stacks of conventional fluorescence images were collected automatically at a Z-distance of 0.2 mm (Metamorph software; Molecular Devices). Images are presented as maximum intensity projections generated with ImageJ software, from stacks deconvolved with an extension of Metamorph software.

Colorimetric PARP assay kit for candidate inhibitor screening: PARP-1 inhibition by dCTP was determined with the HT universal colorimetric PARP assay kit, with histone-coated strip wells (4677-096-K from Trevigen), according to the manufacturer's instructions. In the experiment reported in Figure 5F, biotinylated NAD⁺ (4670-500-01 from Trevigen) was added at the A5 step with the PARP cocktail. Absorbance was measured at 450 nm with a Victor 3 Multilabel Counter plate reader (Perkin Elmer).

Sister chromatid exchange assay. Cells were transferred to slides and cultured in the presence of 10 µM 5-bromodeoxyuridine (BrdU) (Sigma) for two divisions. After 40 h, colchicine (Sigma) was added (0.1 µg/ml) and the cells were incubated for 1 h in a hypotonic solution (1:5 (vol/vol) FCS (Fetal calf

Serum) in distilled water) and the fixed by incubation with a 3:1 (vol/vol) mixture of methanol and acetic acid. They were then stained by incubation with 10 µg/ml Hoechst 33258 (Sigma) in distilled water for 20 minutes, rinsed with 2×SSC (Euromedex), exposed to ultraviolet light at a wavelength of 365 nm, at a distance of 10 cm for 105 minutes, rinsed in water, stained by incubation with 2% Giemsa solution (VWR) for 16 minutes, rinsed in water, dried and mounted in EUKITT (Sigma). Chromosomes were observed with a Leica DMRB microscope at ×100 magnification. Metaphases were captured with a SONY DXC 930 P camera and SCEs were analyzed.

DNA molecular combing. Asynchronous populations of cells were labeled by incubation for 20 minutes with 100 µM IdU (Sigma), washed with medium at 37°C and then labeled by incubation for 20 minutes with 100 µM CldU (Sigma). The DNA solution was prepared as previously described (9), and DNA was combed onto silane-treated coverslips (GenomicVision) with a combing apparatus (Genomic Vision). Coverslips with combed DNA were baked overnight at 60°C and incubated in 0.5 M NaOH and 1 M NaCl for 15 minutes, with gentle shaking, to denature the DNA. The coverslips were washed several times in PBS and dried by successive incubations, for 5 minutes each, in 70, 90 and 100% ethanol. They were then incubated with the primary antibodies. All antibodies were diluted in BlockAid (Life Technologies). Coverslips were incubated at room temperature, first with 1/5 mouse anti-BrdU antibody (BD Biosciences) and 1/25 rat anti-CldU antibody (AbDserotec) for 1 h, then with 1/25 goat anti-mouse Alexa Fluor 488 and 1/25 goat anti-rat Alexa Fluor 555 antibodies (Life Technologies) for 40 minutes, followed by 1/50 mouse anti-ssDNA antibody (Millipore MAB-3034) for 40 minutes, 1/25 rabbit anti-mouse Alexa Fluor 350 antibody (Life Technologies) for 30 minutes and, finally, with 1/25 goat anti-rabbit 350 Alexa Fluor antibody (Life Technologies) for 30 minutes. Between incubations, coverslips were washed three times, for 5 minutes each, in PBS. Coverslips were mounted in Prolong Gold antifade reagent (Life Technologies). Images were acquired with a Leica DM RXA microscope equipped with a motorized XY stage, using a ×40 PlanApo N.A. 1.25 objective and a CoolSNAP HQ interline CCD camera (Photometrics). For each slide, a mosaic of 10×10 partly overlapping images was collected with a Metamorph software (Molecular Devices) routine developed in-house. Image collections were assembled into a mosaic with the ‘Stitching 2D/3D’ plugin³² (available from <http://fly.mpi-cbg.de/~preibisch/software.html>) for ImageJ software (Rasband, W.S., ImageJ, US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland).

Flow cytometry. Cells were collected with accutase (Sigma) and immediately washed in 1 x PBS. They were then incubated with Triton X-100 (0.1%), RNase (100 µg/ml) and 7-AAD (559925 from BD Pharmingen) for 1 h at 37°C. Cell cycle analysis was carried out with a FACSCalibur (Becton-Dickinson), and data were analyzed with FlowJo (Tree Star Inc.).

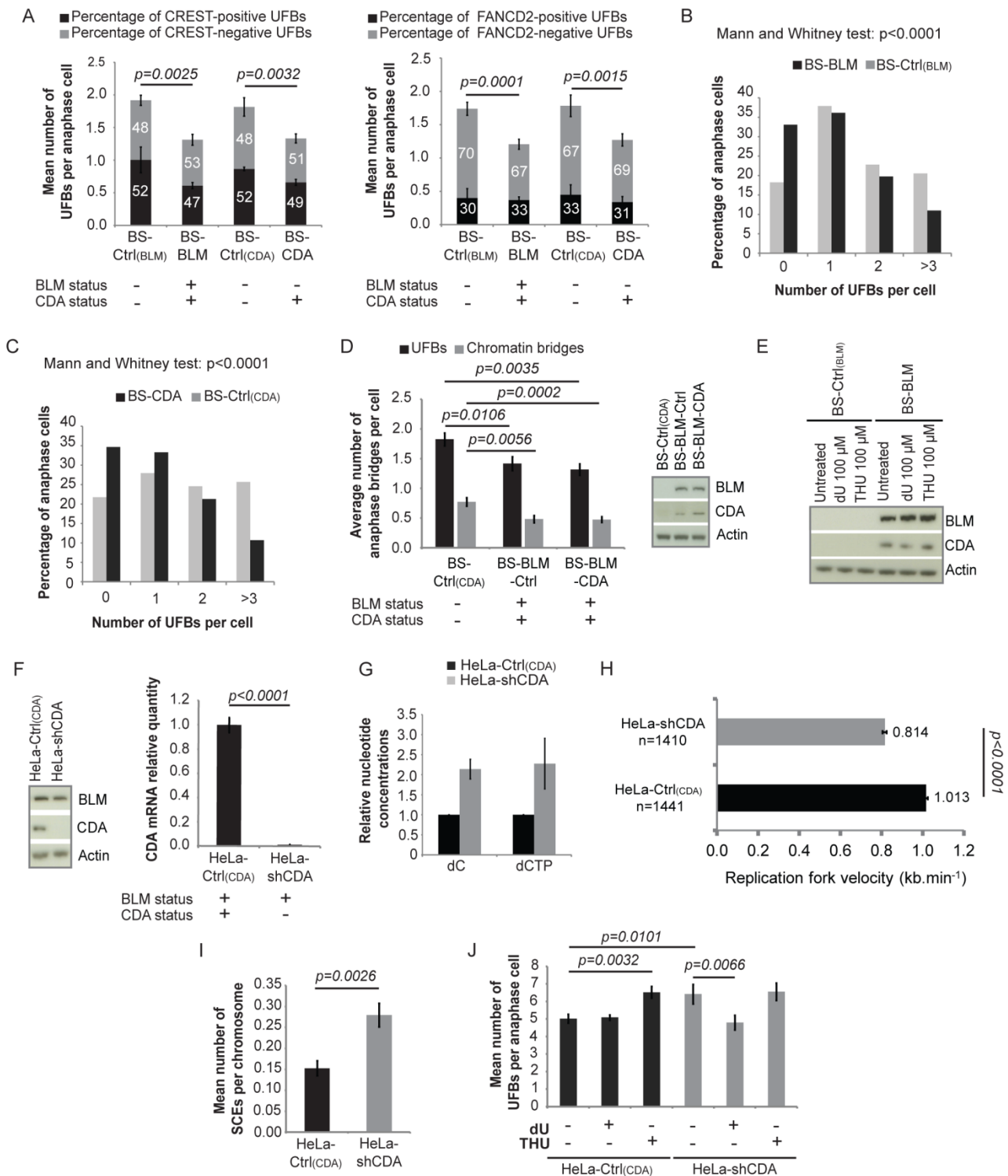


Figure S1

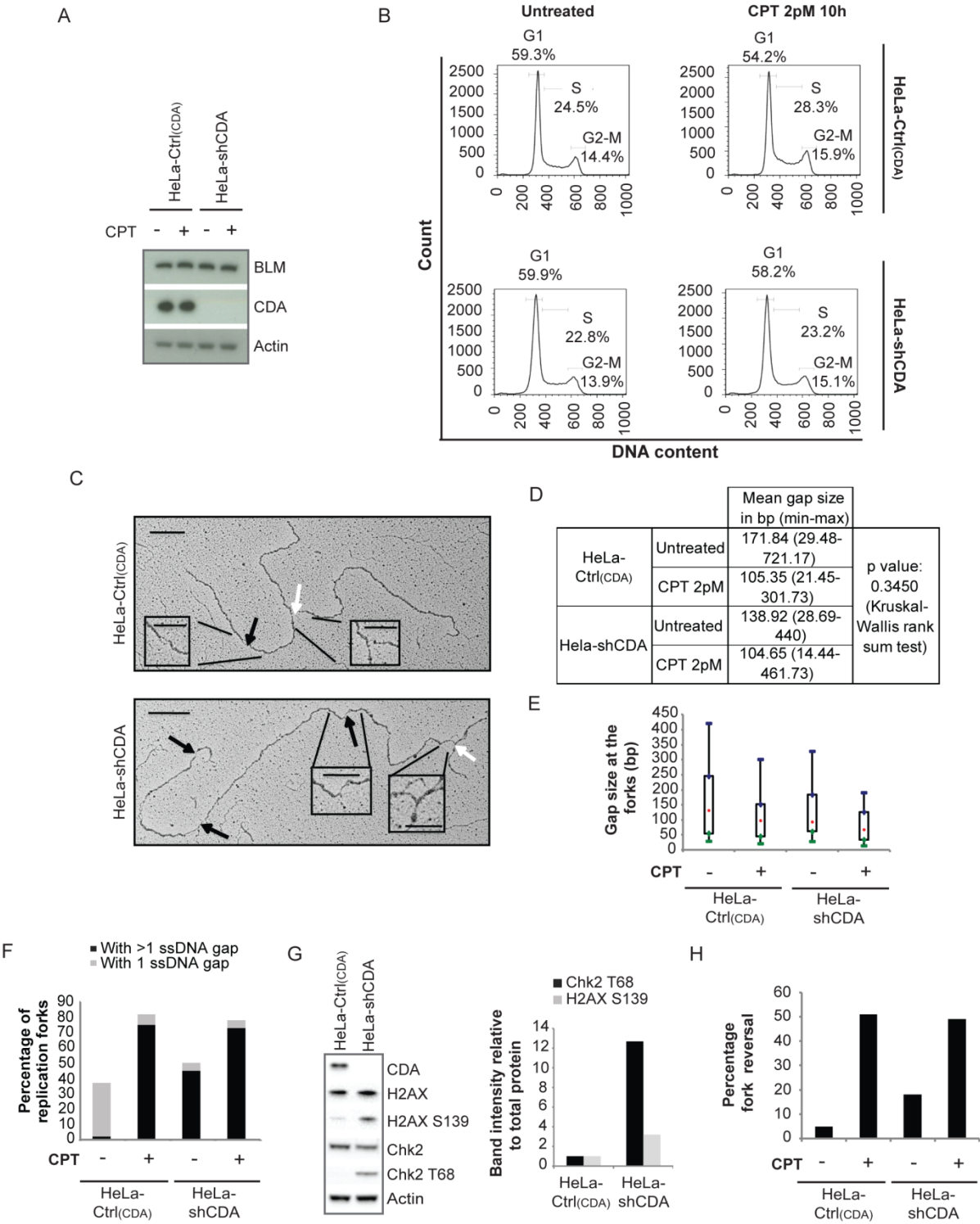


Figure S2

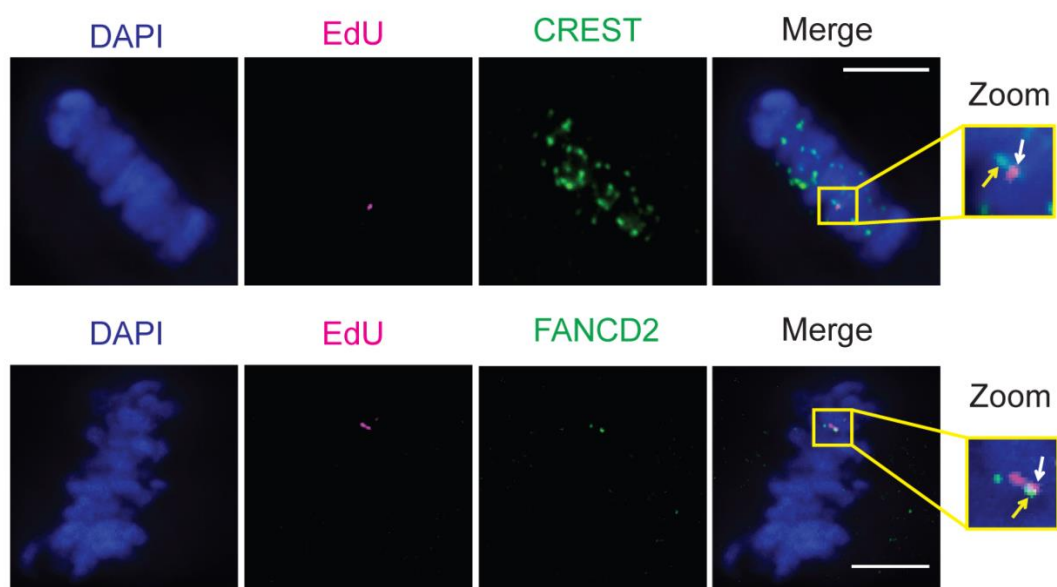


Figure S3

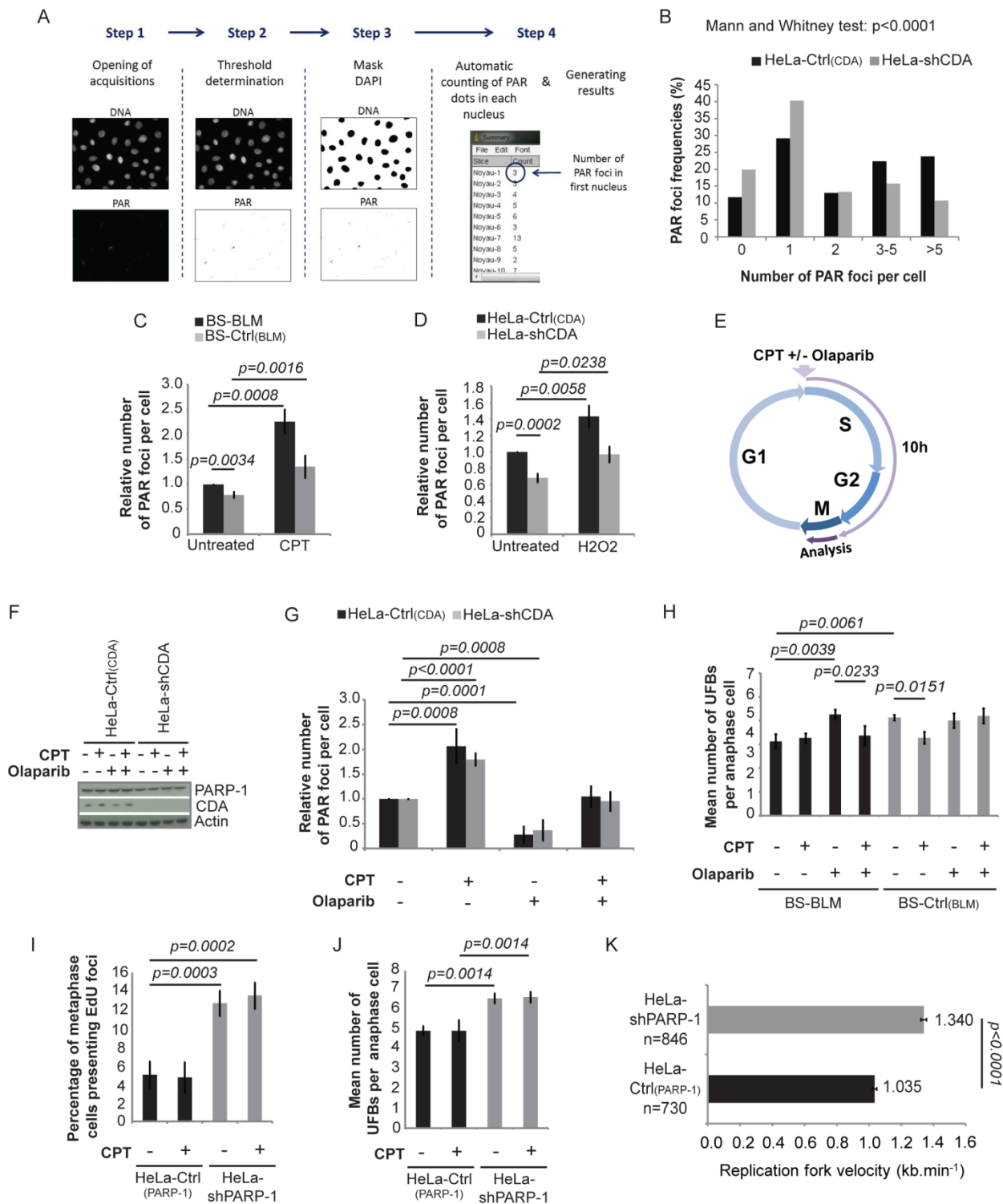


Figure S4

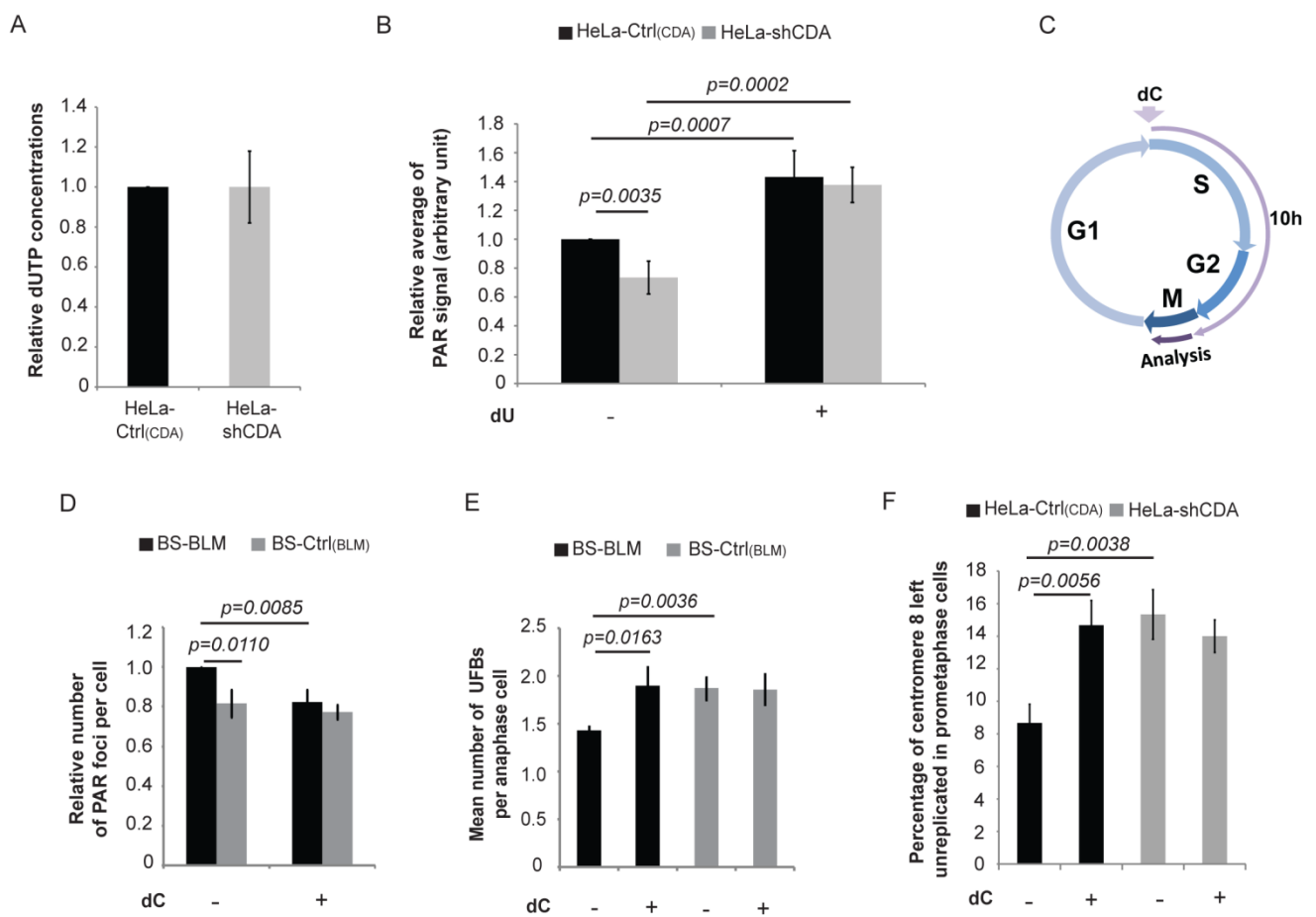


Figure S5

2

Résultats non publiés :

**La déficience en CDA entraîne une
diminution de l'efficacité des points de
contrôle dépendants de Chk1,
favorisant la formation d'UFBs**

CDA deficiency reduces Chk1-dependent checkpoints efficiency promoting UFB formation.

(Article en préparation)

Gemble S, Buhagiar-Labarchède G, Onclercq-Delic R, Lambert S, Amor-Guérét M.

Les travaux de la seconde partie de ma thèse avaient pour objectif de comprendre comment la réduction de l'activité de PARP-1 en absence de la CDA pouvait être à l'origine d'une réplication incomplète de certaines séquences d'ADN conduisant à la formation d'UFBs.

Chk1 est une protéine centrale de la régulation des points de contrôle des phases S et G2-M. Ceux-ci sont notamment chargés d'empêcher la progression dans le cycle cellulaire de cellules présentant de l'ADN endommagé (Sancar *et al.*, 2004). D'un point de vue moléculaire, Chk1 est activée par la kinase ATR qui va la phosphoryler au niveau de ses sérines 317 et 345 (Liu *et al.*, 2000 ; Zhao et Piwnica-Worms, 2001). Ces phosphorylations activent Chk1 en levant son auto-inhibition (Katsuragi et Sagata, 2004 ; Ng *et al.*, 2004). Cela induit notamment la phosphorylation de la phosphatase Cdc25A (« *cell division cycle 25A* ») par Chk1, ce qui entraîne ensuite sa dégradation par le protéasome (Chen *et al.*, 2003 ; Kim *et al.*, 1999 ; Shimuta *et al.*, 2002 ; Sorensen *et al.*, 2003 ; Zhao *et al.*, 2002 ; pour revue : Boutros *et al.*, 2007).

Comme abordé dans l'introduction de ce manuscrit (*cf. Chapitre 3, p.151*), l'interaction de Chk1 avec le PAR stabilise cette dernière au niveau de l'ADN, permettant son activation optimale, ce qui assure une efficacité maximum des points de contrôle qu'elle régule. En absence de PARP-1, Chk1 est moins efficacement retenue à la chromatine, ce qui compromet son activation et affaiblit l'efficacité des points de contrôle dépendants de Chk1 (Min *et al.*, 2013). En outre, l'activation de cette dernière est nécessaire pour prévenir la progression en mitose de cellules présentant des séquences d'ADN non répliquées. En effet, son inhibition provoque l'entrée prématurée de cellules de phase S directement en mitose du fait de l'activation inappropriée d'Aurora B, induisant ainsi l'accumulation de cellules présentant de l'ADN non répliqué en mitose (Zuazua-Villar *et al.*, 2014). Enfin, ATR, la kinase en amont de Chk1, a été associée à une activation du point de contrôle S-M afin d'éviter le passage de cellules en mitose avant la fin de la réplication complète de l'ADN, prévenant ainsi la formation d'UFBs (Eykelenboom *et al.*, 2013).

Ces données suggèrent que ❶ PARP-1 et son activité de PARylation sont nécessaires à l'activation de Chk1 et que ❷ l'activité de cette dernière est indispensable pour prévenir l'entrée en mitose de cellules présentant de l'ADN non répliqué. Or, les cellules déficientes en CDA présentent

une réduction de l'activité de PARP-1 associée à l'accumulation de séquences d'ADN non répliquées perdurant en mitose (Gemble *et al.*, 2015 ; Résultats : partie 1). Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle la déficience en CDA et la diminution de l'activité de PARP-1 qui en découle pourraient affecter l'activation de Chk1 et des cascades de signalisation en aval, ce qui favoriserait l'entrée en mitose de cellules présentant de l'ADN non répliqué, expliquant ainsi la formation subséquente d'UFBs.

La déficience en CDA compromet l'activation de Chk1 et de PARP-1 en réponse à un stress génotoxique :

La phosphorylation S317 de Chk1 constitue un bon marqueur de son activation. Néanmoins, les techniques d'analyses classiques ne sont pas suffisamment sensibles pour visualiser la forme phosphorylée de Chk1 à l'état basal, nous empêchant, dans ces conditions, de déterminer si l'activité de Chk1 est affectée en absence de la CDA. Etant donné que l'activité de Chk1 est induite après un stress (Kastan et Bartek, 2004), nous avons choisi de traiter des cellules exprimant ou non la CDA avec des agents génotoxiques dans le but d'analyser l'activation de Chk1. Ainsi, un traitement avec une dose classique de CPT de 25 nM (Berti *et al.*, 2013) pendant 8 heures (h) induit une phosphorylation de Chk1 visualisable en immunoblot, révélant alors une activation amoindrie de cette dernière en absence de la CDA (Figure 55A-C). En effet, la quantification de la phosphorylation de Chk1 sur quatre immunoblots indépendants montre que celle-ci est significativement moins induite en réponse à 8 h de CPT, dans les lignées n'exprimant pas la CDA ($8,43 \pm 2,31$) en comparaison à des cellules exprimant la CDA ($17,91 \pm 1,01$) (Figure 55B) (soit une réduction de $\approx 50\%$ de la phosphorylation de Chk1). Les mêmes résultats ont été obtenus en utilisant un autre type de stress génotoxique. Chk1 est effectivement moins phosphorylée 1 h après exposition à des UVC (8 Joules) lorsque la CDA n'est pas exprimée (Figure 55D). Enfin, en accord avec les données de la littérature (Min *et al.*, 2013), la phosphorylation de Chk1 est moins induite après ce même traitement dans des lignées déplétées en PARP-1 (Figure 55E). Nos résultats démontrent ainsi que la déficience en CDA conduit à une activation amoindrie de Chk1.

Etant donné que la déplétion de la CDA entraîne une diminution de l'activité basale de PARP-1 (Gemble *et al.*, 2015 ; Résultats : partie 1), nous avons émis l'hypothèse selon laquelle la réduction de l'activité de PARP-1 pourrait compromettre l'activation optimale de Chk1. Afin de le vérifier, nous avons déterminé si le différentiel d'activité de PARP-1 en fonction du statut de la CDA est conservé en réponse à un stress. L'analyse par immunofluorescence du nombre de foyers de PARylation a montré qu'un traitement avec 25 nM de CPT conduit à une fréquence significativement moins élevée de foyers de PARylation dans les cellules déplétées en CDA ($4,06$), par rapport à leur contrôle ($7,45$)

(Figure 55F-G). La même constatation a été faite après exposition à des UVC (8 J) (Figure 55H). Ces données démontrent qu'en absence de la CDA, l'activation de PARP-1 est amoindrie après un stress, reproduisant ainsi les observations faites à l'état basal.

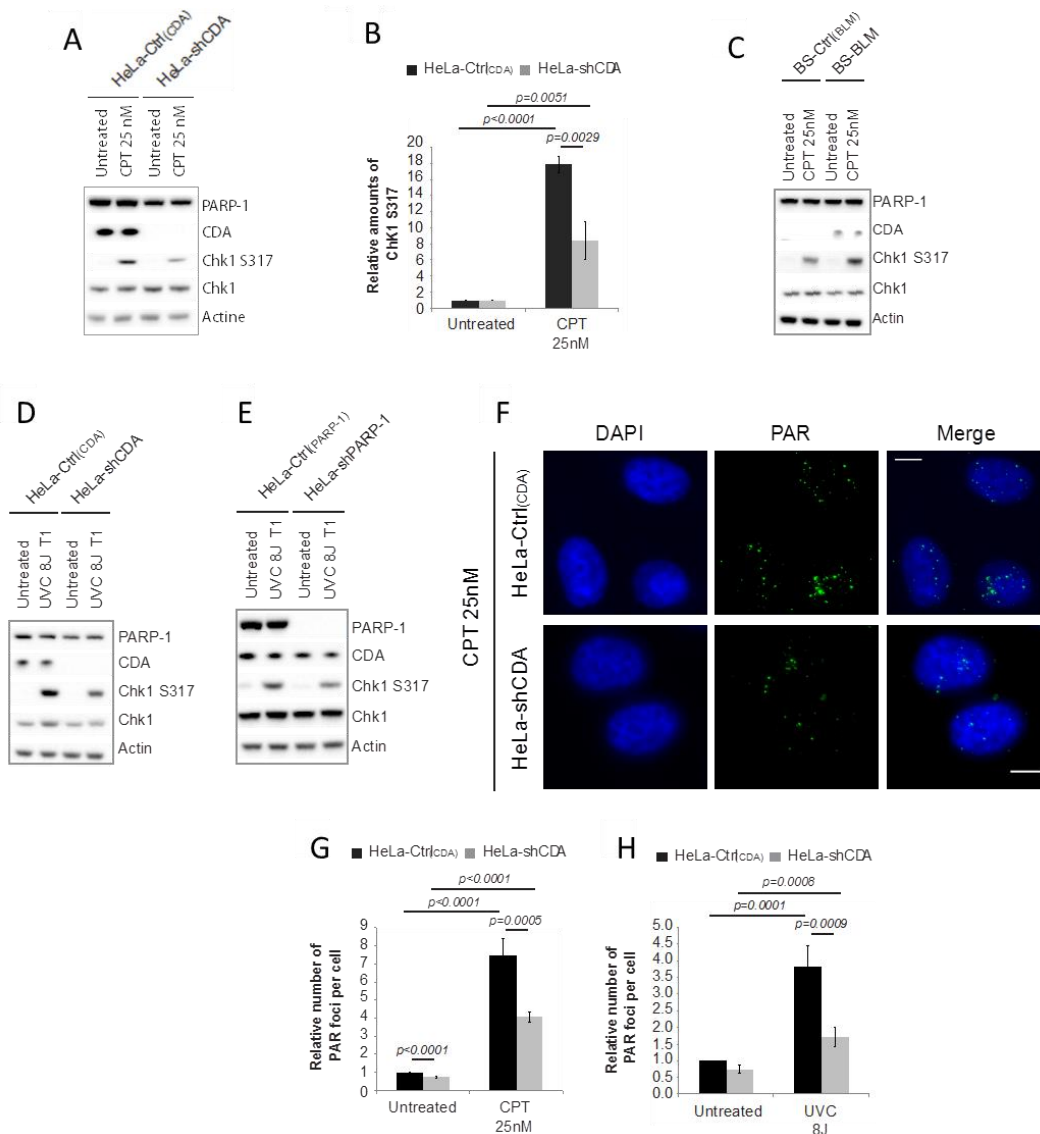


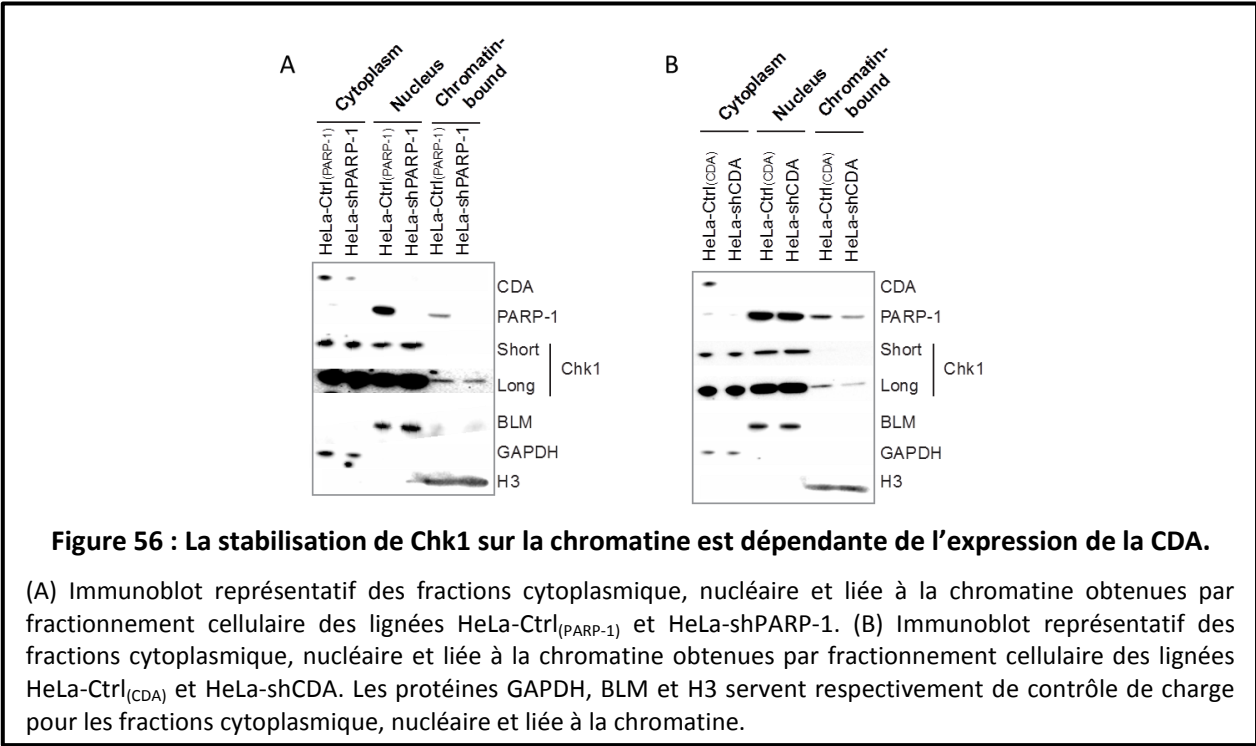
Figure 55 : La déficience en CDA compromet l'activation de Chk1 et de PARP-1 en réponse à un stress génotoxique.

(A) Immunoblot représentatif de l'expression de Chk1 S317 dans les lignées HeLa-Ctrl_(CDA) et HeLa-shCDA, traitées ou non avec 25 nM de CPT pendant 8 h. (B) Expression moyenne de Chk1 S317 quantifiée sur quatre immunoblots indépendants. (C) Immunoblot représentatif de l'expression de Chk1 S317 dans les lignées BS-Ctrl_(BLM) et BS-BLM, traitées ou non avec 25 nM de CPT pendant 8 h. (D-E) Immunoblot représentatif de l'expression de Chk1 S317 dans les lignées HeLa-Ctrl_(CDA), HeLa-shCDA, HeLa-Ctrl_(PARP-1) et HeLa-shPARP-1, 1 h après exposition ou non à 8 J d'UVC. (F) Images d'immunofluorescences représentatives des lignées HeLa-Ctrl_(CDA) et HeLa shCDA, traitées avec 25 nM de CPT. L'ADN est marqué par le DAPI (en bleu), les foyers PARs sont révélés par un anticorps spécifique du PAR (en vert). Barre d'échelle : 5 μm. (G) Nombre relatif de foyers PAR par cellules dans les lignées HeLa-Ctrl_(CDA) (barres noires) et HeLa-shCDA (barres grises), traitées ou non avec 25 nM de CPT (n=4 ; > 530 cellules analysées). (H) Nombre relatif de foyers PAR par cellules dans les HeLa-Ctrl_(CDA) (barres noires) et HeLa-shCDA (barres grises), exposées ou non à 8 J d'UVC (n=4 ; > 500 cellules analysées). Les barres d'erreurs représentent la moyenne ± l'écart-type. La significativité a été calculée avec le test t de Student.

L'ensemble de ces résultats suggère donc, qu'en réponse à un stress génotoxique, les cellules déficientes en CDA présentent une activité amoindrie de PARP-1, qui pourrait compromettre l'activation de Chk1.

La stabilisation de Chk1 sur la chromatine est dépendante de l'expression de la CDA :

L'activation optimale de Chk1 est rendue possible par sa stabilisation sur l'ADN, elle-même dépendante de la présence et de l'activité de PARP-1 à la chromatine (Min *et al.*, 2013). Dans le but de déterminer si les recrutements de PARP-1 et de Chk1 à la chromatine pourraient être affectés en absence de la CDA, ce qui pourrait expliquer nos résultats précédents, nous avons réalisé des fractionnements cellulaires. Afin de s'assurer que chaque fraction est bien isolée l'une de l'autre, les protéines GAPDH, BLM et H3 ont respectivement été utilisées comme contrôles pour les fractions cytoplasmique, nucléaire et liée à la chromatine (Figure 56A-B).



Nous avons d'abord montré que la protéine Chk1 était moins abondante dans la fraction liée à la chromatine en absence de PARP-1 (Figure 56A), corroborant ainsi les données de la littérature (Min *et al.*, 2013) et confirmant que l'activité et la présence de PARP-1 sont nécessaires à la stabilisation de Chk1 à la chromatine. De façon intéressante, en absence de la CDA, Chk1, mais aussi PARP-1, sont moins abondantes dans la fraction associée à la chromatine (Figure 56B). Cette seconde observation montre que la déficience en CDA affecte à la fois le recrutement de PARP-1 et la stabilisation de Chk1

sur la chromatine. Ces données suggèrent qu'en absence de la CDA, la diminution du recrutement et de l'activité de PARP-1 à la chromatine déstabilisent Chk1 au niveau de l'ADN compromettant ainsi son activation optimale.

La déficience en CDA affaiblit l'efficacité des points de contrôle régulés par Chk1 :

L'efficacité des points de contrôle de réponse aux dommages de l'ADN de phases S et G2-M est dépendante de l'activité de Chk1 (pour revue : Smits et Gillespie, 2015). Nous avons donc déterminé si la diminution de l'activation de cette dernière en absence de la CDA se traduisait par un impact fonctionnel sur les points de contrôle régulés par celle-ci.

En réponse à des dommages de l'ADN, l'activation du point de contrôle de phase S conduit à un arrêt de la synthèse d'ADN visualisable par cytométrie en flux grâce à la diminution de l'incorporation d'EdU. Il est alors possible de déterminer la proportion de synthèse d'ADN relative à la condition non traitée, qui reflète la capacité des cellules à stopper la synthèse d'ADN après un stress. Expérimentalement, les cellules ont été exposées à des UVC (8 J) puis de l'EdU a été ajouté au milieu de culture pendant 1 h, soit immédiatement après les UVC (T0), soit 16 h après (T16). Les cellules ont ensuite été fixées et analysées par cytométrie en flux. Après expositions aux UVC (T0), le pourcentage relatif de synthèse d'ADN est plus important dans les cellules n'exprimant pas PARP-1 ($\approx 80\%$) en comparaison de leur contrôle ($\approx 50\%$) (Figure 57A), confirmant les données précédemment publiées (Min *et al.*, 2013). De manière intéressante, après le même traitement, le pourcentage relatif de synthèse d'ADN est également plus important dans les cellules n'exprimant pas la CDA ($\approx 70\%$) par rapport à leur contrôle ($\approx 40\%$) (Figure 57B). Ces résultats démontrent, qu'en absence de la CDA ou de PARP-1, la synthèse d'ADN perdure davantage, malgré la présence d'un stress génotoxique révélant ainsi une réduction de l'efficacité du point de contrôle de phase S.

Le rétablissement du pourcentage relatif de synthèse d'ADN à un niveau similaire au contrôle 16 h après exposition aux UVC (T16), suggère un effet transitoire qui ne correspond pas à un mécanisme lié à l'apoptose, mais à l'activation provisoire du point de contrôle le temps de réparer les dommages. Afin de s'assurer que la réduction de la proportion de synthèse d'ADN observée est bien dépendante de l'activité de Chk1, nous avons inhibé cette dernière avec le CHIR124 (Tse *et al.*, 2007). Un traitement avec cette drogue induit l'accumulation de Cdc25A (Figure 57C), prouvant son efficacité. L'ajout de 400 nM de CHIR124 au milieu de culture 3 h avant l'exposition aux UVC, aboli dans les cellules exprimant ou non la CDA, la réduction du pourcentage de synthèse d'ADN après CPT (Figure 57D), confirmant que celle-ci est bien dépendante de l'activité de Chk1.

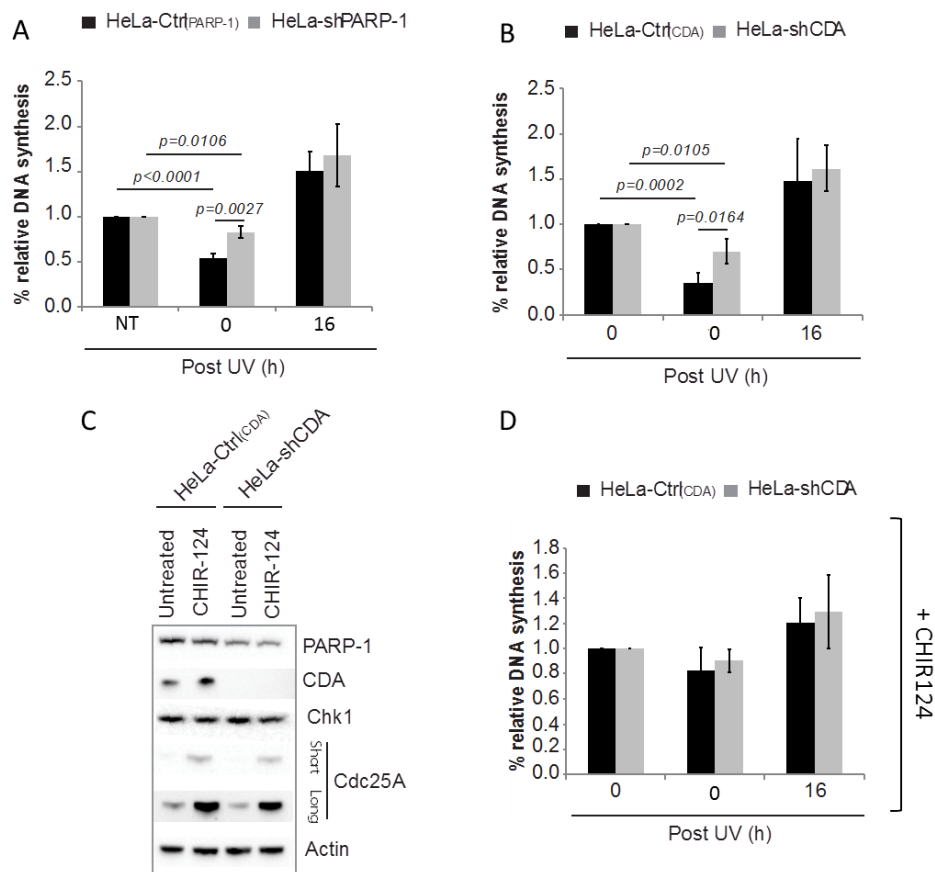


Figure 57 : L'arrêt de la synthèse d'ADN est compromis dans les lignées n'exprimant pas la CDA.

(A) Pourcentage relatif de synthèse d'ADN dans les lignées HeLa-Ctrl_(PARP-1) (barres noires) et HeLa-shPARP-1 (barres grises), après exposition ou non à des UVC (8J) (n=4). (B) Pourcentage relatif de synthèse d'ADN dans les lignées HeLa-Ctrl_(CDA) (barres noires) et HeLa-shCDA (barres grises), après exposition ou non à des UVC (8J) (n=3). (C) Immunoblot représentatif de l'expression de Cdc25A dans les cellules HeLa-Ctrl_(CDA) et HeLa shCDA, traitées ou non avec 400 nM de CHIR124 pendant 8 h. (D) Pourcentage relatif de synthèse d'ADN dans les lignées HeLa-Ctrl_(CDA) (barres noires) et HeLa-shCDA (barres grises), préalablement traitées avec 400 nM de CHIR124 (inhibiteur de Chk1) pendant 3 h puis exposées ou non à des UVC (8J) (n=4). Les barres d'erreurs représentent la moyenne \pm l'écart-type. La significativité a été calculée avec le test t de Student.

L'activation du point de contrôle de phase S se traduit également par l'arrêt des cellules en phase S. En accord avec les résultats précédents, les cellules n'exprimant pas la CDA s'accumulent moins en phase S par rapport à leur contrôle, aussi bien après un traitement avec 25 nM de CPT pendant 8 h (36% vs 26%) que 8 h après exposition à des UVC (8 J) (35% vs 27%) (Figure 58A-C). Encore une fois, afin de s'assurer que l'arrêt des cellules en phase S est bien dépendant de l'activité de Chk1, nous avons inhibé cette dernière soit directement en utilisant le CHIR124 soit en inhibant sa kinase, ATR, avec le VE-821 (Prevo *et al.*, 2012). Celui-ci induit, comme attendu, le passage des cellules en mitose, révélé par l'augmentation de l'H3S10, ce qui confirme l'efficacité de cette drogue (Figure S1A, p.232). L'ajout, en parallèle des traitements précédents, de 400 nM de CHIR124 ou de 10 μ M de VE-821 pendant 8 h prévient l'accumulation des cellules en phase S (Figure S1B-C, p.232), confirmant que celle-ci est bien dépendante de l'activité de Chk1.

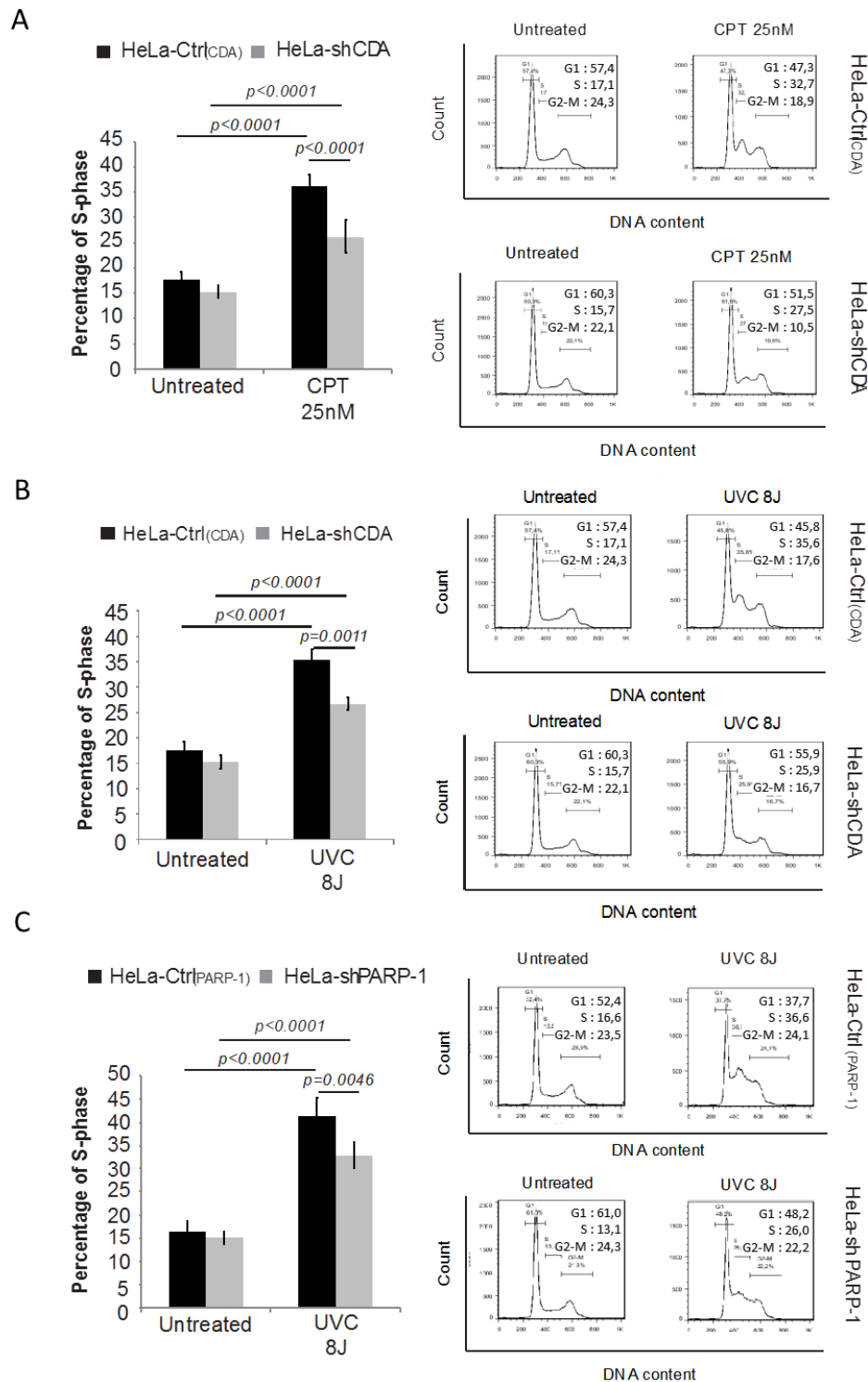
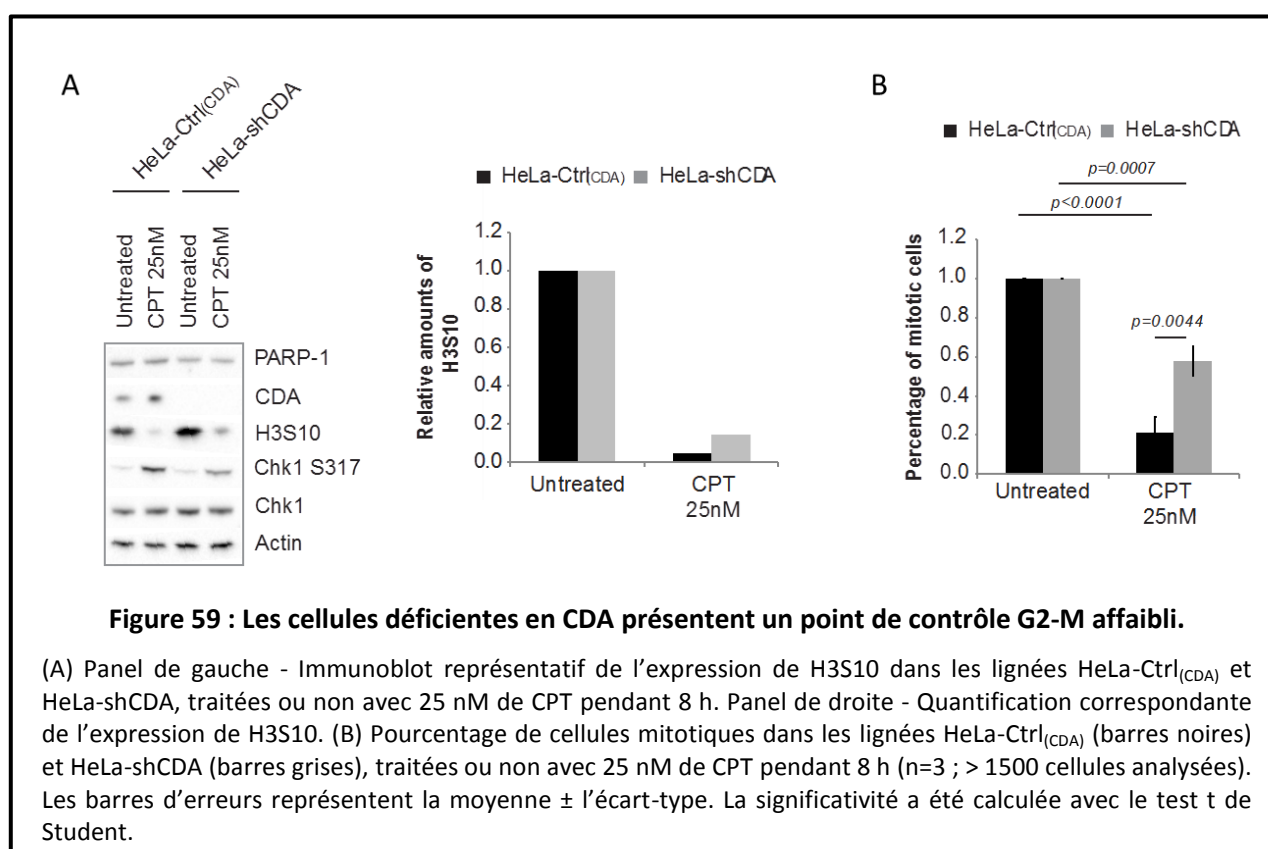


Figure 58 : Les cellules déficientes en CDA ou en PARP-1 s'accumulent moins en phase S en réponse à un stress génotoxique.

(A-B) Pourcentage de cellules en phase S dans les lignées HeLa-Ctrl_(CDA) (barres noires) et HeLa-shCDA (barres grises), traitées ou non avec (A) 25 nM de CPT pendant 8 h (n=8) ou (B) 8 h après exposition ou non à 8 J d'UVC (n=3). (C) Pourcentage de cellules en phase S dans les lignées HeLa-Ctrl_(PARP-1) (barres noires) et HeLa-shPARP-1 (barres grises) 8 h après exposition ou non à 8 J d'UVC (n=7). (A-C) Panel de droite - Distribution représentative des cellules en fonction des phases du cycle cellulaire. Les barres d'erreurs représentent la moyenne \pm l'écart-type. La significativité a été calculée avec le test t de Student.

Enfin, Chk1 régule également le point de contrôle de G2-M dont l'activation se traduit par l'arrêt des cellules avant l'entrée en mitose. L'analyse du marqueur mitotique H3S10 par immunoblot montre qu'après un traitement avec 25 nM de CPT pendant 8 h, celui-ci est plus exprimé dans les cellules déficientes en CDA par rapport à leur contrôle (Figure 59A). En outre, la proportion relative de cellules entrant en mitose après ce traitement est plus importante dans les cellules déplétées en CDA ($\approx 20\%$) en comparaison de leur contrôle ($\approx 58\%$) (Figure 59B). Ces résultats suggèrent donc qu'en absence de la CDA, l'activation du point de contrôle de G2-M est amoindrie, permettant le passage en mitose de certaines cellules, malgré un stress génotoxique. Ces résultats révèlent, dans des cellules déficientes en CDA, une réduction de l'activation des cascades de signalisation situées en aval de Chk1 en réponse à un stress génotoxique.



L'inhibition des points de contrôle régulés par Chk1 favorise la formation d'UFBs :

L'inhibition de Chk1 ou d'ATR, conduit à l'entrée prématurée de cellules de la phase S en mitose, induisant par conséquent la présence d'ADN non répliqué en mitose (Zuazua-Villar *et al.*, 2014 ; Eykelenboom *et al.*, 2013). Or, la déficience en CDA est associée à l'augmentation de la quantité d'ADN non répliqué perdurant en mitose elle-même à l'origine de la formation d'UFBs. Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle l'activation amoindrie de Chk1 dans les cellules déficientes en

CDA, permettrait le passage en mitose de cellules n'ayant pas achevé de répliquer certaines séquences d'ADN.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons inhibé Chk1 ou ATR afin de provoquer l'entrée en mitose de cellules dont l'ADN est partiellement répliqué. Le traitement des cellules avec 400 nM de CHIR124 ou 10 μ M de VE-821 pendant 8 h conduit, dans les deux cas, à une augmentation de la fréquence des UFBs dans des cellules exprimant la CDA, mais pas dans des cellules déplétées en CDA (Figure 60A-C). Cette première observation démontre que l'activité de Chk1 est nécessaire pour prévenir l'accumulation de séquences d'ADN non répliquées en mitose. L'inhibition de Wee1, notamment par un traitement au MK-1775, est également associée à une entrée forcée des cellules de phase S directement en mitose du fait de l'activation prématurée de Cdk1 (Aarts *et al.*, 2012 ; Davies *et al.*, 2011). Dans le but de confirmer nos précédents résultats, nous avons donc inhibé la protéine Wee1 et analysé la fréquence des UFBs. Un traitement de nos lignées avec cet inhibiteur conduit à l'augmentation du marqueur mitotique H3S10, révélée par immunoblot (Figure 60D), confirmant ainsi son efficacité. De manière similaire à l'inhibition précédente de Chk1, le traitement des cellules avec 400 nM de MK-1775 pendant 8 h induit une augmentation de la fréquence des UFBs dans les cellules exprimant la CDA mais pas dans les cellules déficientes en CDA (Figure 60E). L'ensemble de ces données renforcent notre modèle selon lequel les UFBs correspondent à de l'ADN non répliqué et démontre le rôle primordial des points de contrôle régulés par Chk1 pour prévenir leur formation. En outre, le fait que l'inhibition de cette dernière n'affecte pas la fréquence des UFBs en absence de la CDA corrobore que Chk1 et la CDA agissent dans la même voie pour prévenir la formation de ces structures.

Nous avons précédemment montré qu'un traitement avec une dose très faible de CPT (2pM pendant 8h) permet de réactiver PARP-1 et de prévenir la formation des UFBs dans les cellules déficientes en CDA (Gemble *et al.*, 2015 ; Résultats : partie 1). Nous avons donc déterminé si ce mécanisme est dépendant de l'activité de Chk1. Pour cela, nous avons traité pendant 8h des cellules, exprimant ou non la CDA, en présence ou en absence de 2 pM de CPT et de 400 nM de CHIR124 ou 10 μ M de VE-821. Comme attendu, l'ajout de 2 pM de CPT pendant 8 h prévient la formation des UFBs dans les cellules déficientes en CDA (Figure S2A-B, p.233). Cependant, lorsque Chk1 ou ATR sont inhibées, ce même traitement ne permet plus de prévenir la formation des UFBs (Figure S2A-B, p.233). La réactivation de PARP-1 par une dose très faible de CPT n'est donc pas suffisante pour prévenir la formation des UFBs si Chk1 est inhibée. Ensemble, ces résultats suggèrent que le rôle de PARP-1 dans la prévention des UFBs est strictement dépendant de l'activation optimale de Chk1.

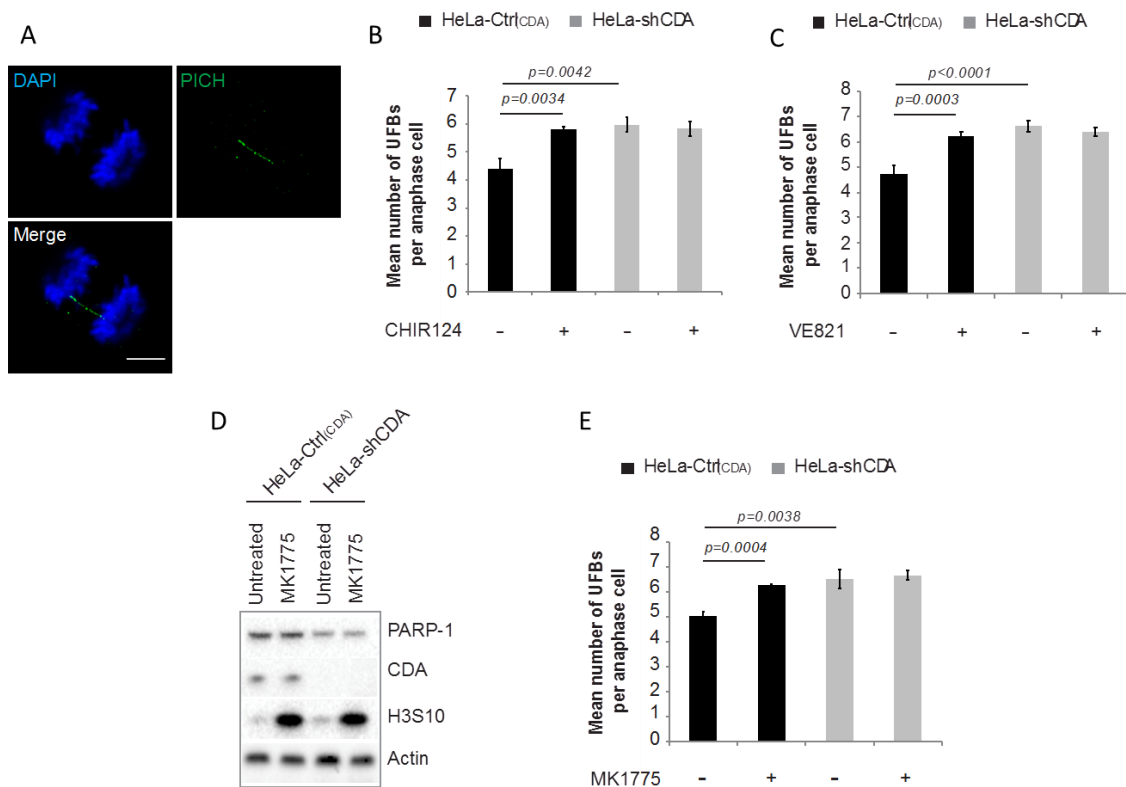


Figure 60 : L'inhibition des points de contrôle régulés par Chk1 favorise la formation d'UFBs.

(A) Images d'immunofluorescences représentatives d'un UFB. L'ADN mitotique est marqué par le DAPI (en bleu). L'UFB est détecté grâce à un anticorps spécifique de PICH (en vert). (B-C) Nombre moyen d'UFBs par anaphase dans les lignées HeLa-Ctrl(CDA) (barres noires) et HeLa-shCDA (barres grises) traitées ou non avec (B) 400 nM de CHIR124 (inhibiteur de Chk1) ou (C) 10 μ M de VE-821 (inhibiteur d'ATR) pendant 8 h ($n=3$; > 100 anaphases analysées). (D) Immunoblot représentatif de l'expression de H3S10 dans les lignées HeLa-Ctrl(CDA) et HeLa-shCDA traitées ou non avec 400 nM de MK-1775 (inhibiteur de Wee1) pendant 8 h. (E) Nombre moyen d'UFBs par anaphase dans les lignées HeLa-Ctrl(CDA) (barres noires) et HeLa-shCDA (barres grises) traitées ou non avec 400 nM de MK-1775 pendant 8 h ($n=3$; > 100 anaphases analysées). Les barres d'erreurs représentent la moyenne \pm l'écart-type. La significativité a été calculée avec le test t de Student.

En résumé, les données de cette étude démontrent que :

- ① La déficience en CDA réduit l'activité et le recrutement de PARP-1 à la chromatine ce qui compromet l'activation optimale de Chk1 en réponse à un stress.
- ② La réduction de l'activité de Chk1 se traduit par une diminution de l'efficacité des points de contrôle qu'elle régule ce qui favorise probablement le passage en mitose de cellules présentant de l'ADN non répliqué, expliquant par conséquent l'augmentation des UFBs en absence de la CDA.

Nos résultats ont donc permis d'identifier un lien insoupçonné entre le pool de nucléotides et l'activité de Chk1, révélant ainsi l'importance des points de contrôle dans la surveillance de l'ADN non répliqué et dans la prévention de la formation des UFBs.

Sur la base de ces résultats nous avons proposé le modèle suivant : dans des cellules exprimant la CDA (panel de gauche), le recrutement de PARP-1 à l'ADN et son activité basale stabilisent Chk1 sur l'ADN. Cela permet l'activation optimale de cette dernière, ce qui induit une efficacité adéquate des points de contrôle qu'elle régule, empêchant ainsi le passage en mitose de cellules présentant de l'ADN non répliqué. La perte d'expression de la CDA (panel de droite) conduit ① à une réduction de l'activité et du recrutement de PARP-1 à la chromatine, ce qui ② déstabilise Chk1 et compromet son activation optimale. Cela a pour conséquence ③ une diminution de l'efficacité des points de contrôle régulés par cette dernière ce qui ④ favorise le passage de cellules présentant des séquences d'ADN non répliquées en mitose. Après l'initiation de la ségrégation des chromatides, ⑤ ces séquences formeront un excès d'UFBs caractéristiques des cellules n'exprimant pas la CDA (Figure 61).

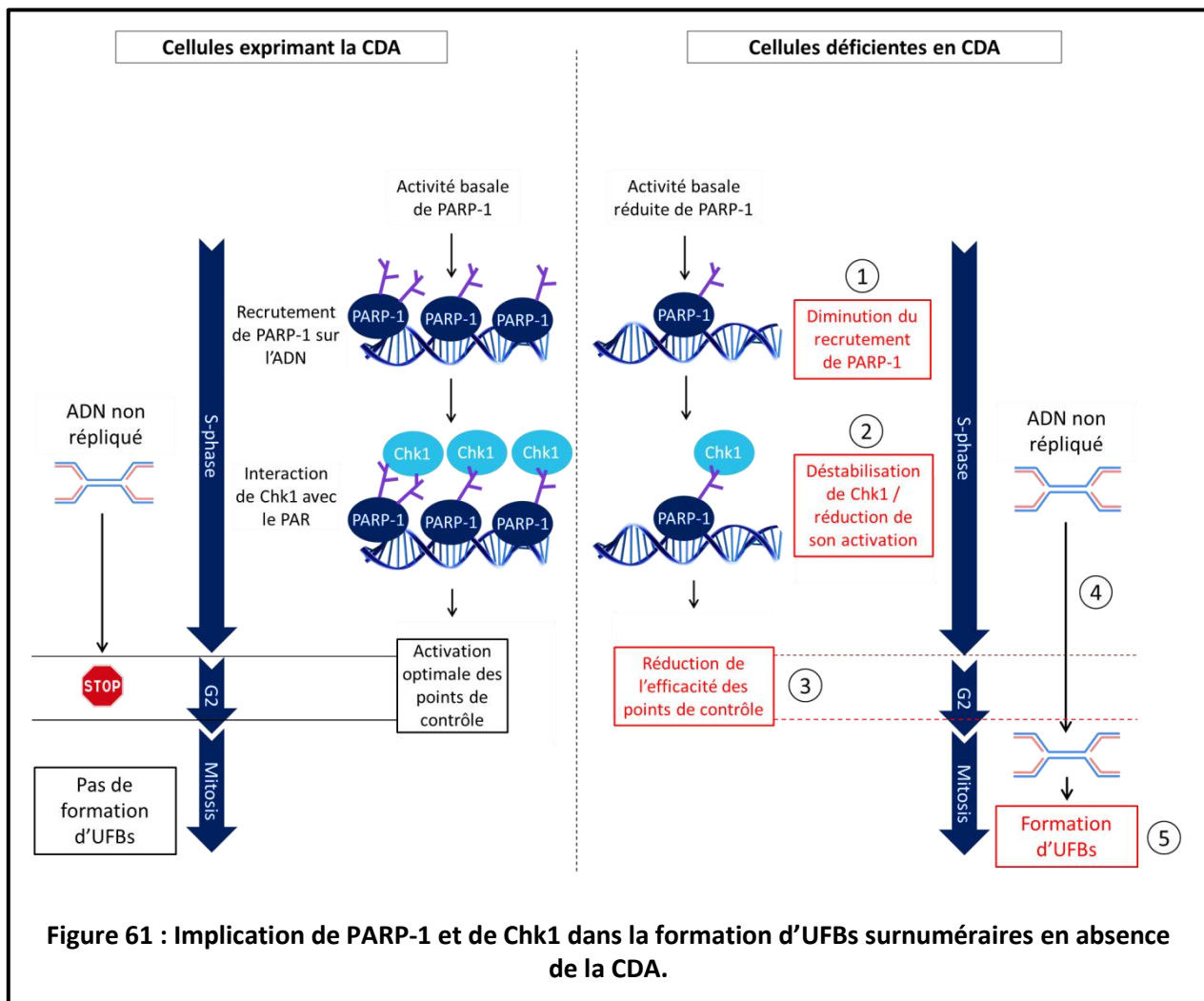


Figure 61 : Implication de PARP-1 et de Chk1 dans la formation d'UFBs surnuméraires en absence de la CDA.

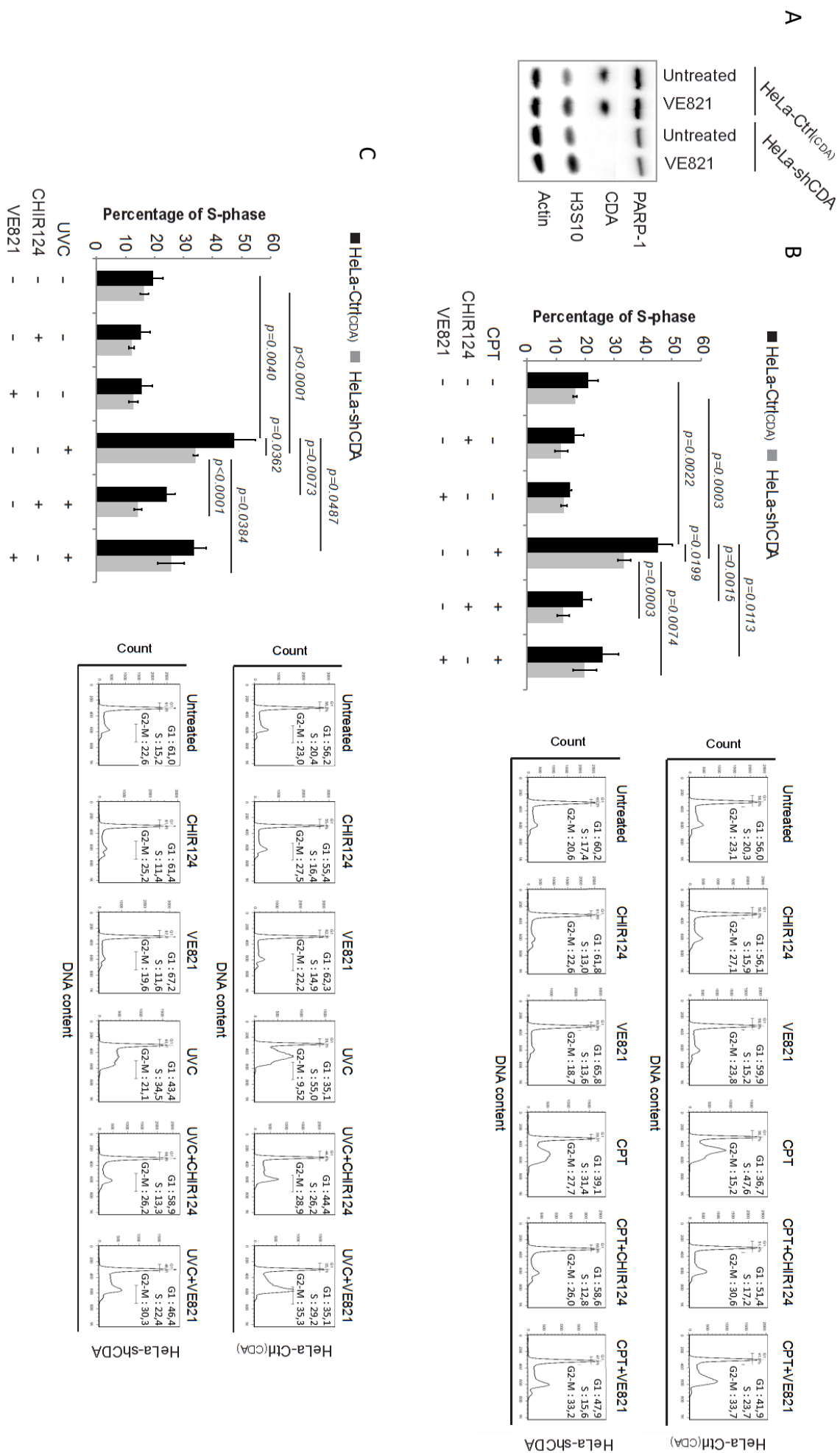


Figure S1 : L'arrêt en phase S après un stress génotoxique est dépendant de l'activité de Chk1.

(A) Immunoblot représentatif de l'expression de H3S10 dans les lignées Hela-Ctrl(CDA) et Hela-shCDA traitées ou non avec 10 μ M de VE-821 pendant 8 h. (B-C) Panel de gauche - Pourcentage de cellules en phase S dans les lignées Hela-Ctrl(CDA) (barres noires) et Hela-shCDA (barres grises) traitées ou non avec (B) 25 nM de CPT pendant 8 h (n=8) ou (C) exposées ou non à 8 j d'UVC +/6 400 nM de CHR124 ou 10 μ M de VE821. Panel de droite - Distribution représentative des cellules Hela-Ctrl(CDA) et Hela-shCDA en fonction des phases du cycle cellulaire. Les barres d'erreurs représentent la moyenne \pm l'écart-type. La significativité a été calculée avec le test t de Student.

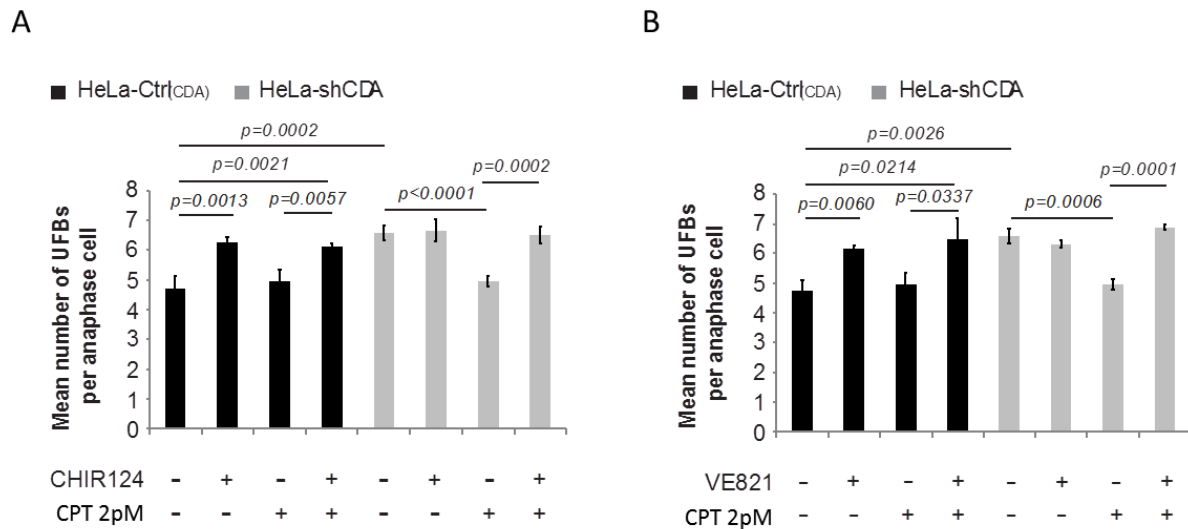


Figure S2 : Les activités de Chk1 et d'ATR sont nécessaires pour prévenir la formation d'UFBs surnuméraires par un traitement par 2pM de CPT.

(A-B) Nombre moyen d'UFBs par anaphase dans les lignées HeLa-Ctrl(CDA) et HeLa-shCDA traitées ou non avec 2 pM de CPT pendant 8 h +/- (A) 400 nM de CHIR124 (n=4 ; > 100 anaphases analysées) ou (B) 10µM de VE-821 (n=4 ; > 100 anaphases analysées). Les barres d'erreurs représentent la moyenne \pm l'écart-type. La significativité a été calculée avec le test t de Student.

3

Résultats non publiés :

**L'activité de PARP-1 participe à la
séparation correcte des chromatides
sœurs avant l'anaphase**

PARP-1 activity contributes to the correct sister-chromatid disjunction before the anaphase onset.

(Article en préparation)

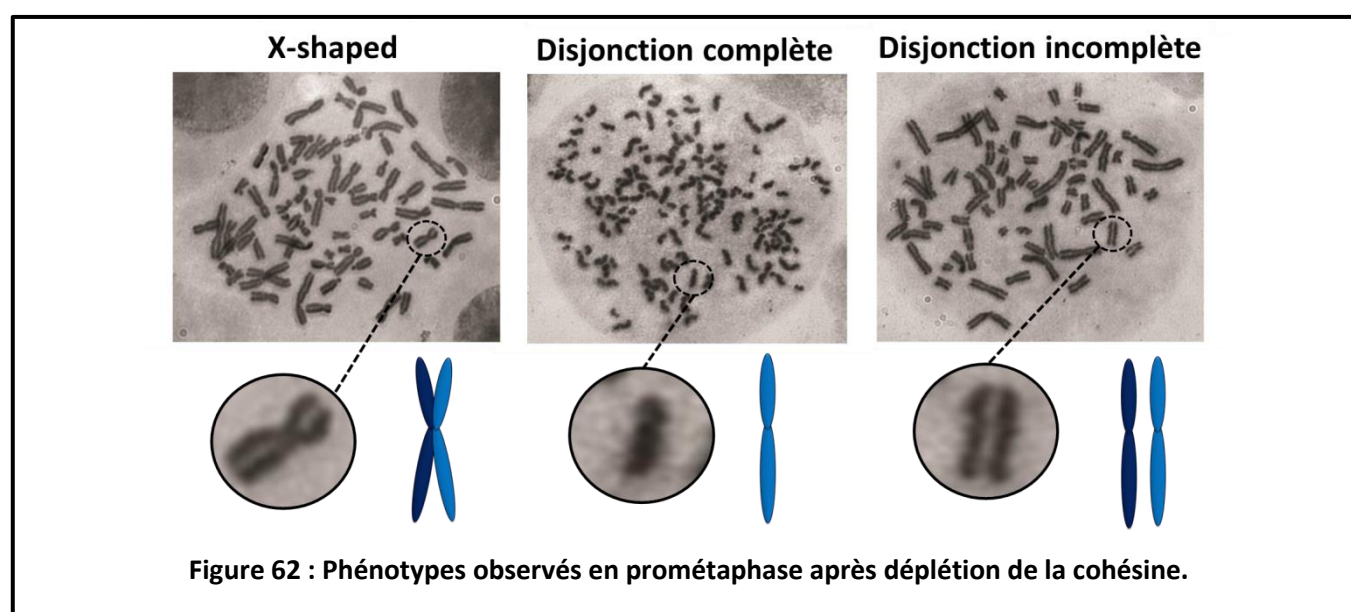
Gemble S, Buhagiar-Labarchède G, Onclercq-Delic R, Amor-Guéret M.

A mon arrivée au laboratoire, j'ai participé à une étude basée sur l'analyse de la séparation des chromatides sœurs en mitose en absence de BLM (Rouzeau et al., 2012 ; Annexes p.291). Ces travaux nous ont notamment permis de montrer que la déplétion de la cohésine, dans des cellules déficientes en BLM ou PICH, conduit à une disjonction incomplète des chromatides sœurs en prométaphase.

Etant donné que l'absence de protéine BLM fonctionnelle induit la perte d'expression de la CDA (Chabosseau et al., 2011), et que cette dernière est à l'origine de certaines anomalies de ségrégation des chromatides sœurs telles que la formation d'UFBs surnuméraires (Gemble et al., 2015 ; Résultats partie 1), nous avons étudié l'implication potentielle de la déficience en CDA dans ce mécanisme.

Lors de la mitose, l'élimination de la cohésion existant entre les chromatides sœurs est nécessaire pour permettre la ségrégation correcte des chromosomes. Cette cohésion est établie par la cohésine présente tout le long du chromosome (pour revue : Losada, 2014). Chez la levure, l'élimination de la cohésine se fait en une seule étape au moment de la transition métaphase-anaphase (Ciosk et al., 1998 ; Funabiki et al., 1996). En revanche, chez les vertébrés, ce mécanisme se déroule en deux étapes. La première consiste en la dissociation de la cohésine des bras des chromosomes dès l'entrée en mitose (Losada et al., 2002 ; Waizenegger et al., 2000). En début de prométaphase, il ne persiste donc que les cohésines des régions centromériques, vraisemblablement protégées par une protéine appelée Shugoshine (Waizenegger et al., 2000). La seconde étape a lieu à la transition métaphase-anaphase. A ce moment-là, la séparase est activée et va cliver la protéine RAD21, aussi appelée Scc1 (« sister chromatid cohesion 1 »), qui représente la sous-unité clivable de la cohésine (Sonoda et al., 2001 ; Losada, 2007). Le clivage de RAD21 induit le retrait des cohésines centromériques, ce qui constitue le signal d'entrée en anaphase, permettant l'initiation de la séparation des chromatides sœurs (Hauf et al., 2001 ; Nakajima et al., 2007 ; Uhlmann et al., 2000).

La déplétion de la protéine RAD21 par ARN interférence, avant la transition métaphase-anaphase, conduit à l'élimination de la cohésine des centromères entraînant la perte de cohésion des chromatides sœurs et la mise en évidence d'anomalies de séparation des chromatides. Les chromosomes prométaphasiques peuvent en effet présenter trois phénotypes (Figure 62). ① Le premier nommé « *X-shaped* » est minoritaire et correspond à l'apparence classique des chromosomes, dites en « X », observée lors d'un étalement chromosomique sans déplétion de la cohésine. Pour cette raison, celui-ci résulte très probablement de cellules non transfectées par le siRNA et reflète donc l'efficacité de transfection. ② Le second phénotype observé correspond au phénotype attendu. La déplétion de la cohésine se traduit par la séparation totale des deux chromatides sœurs qui apparaissent alors indépendantes l'une de l'autre. Il s'agit de « disjonction complète ». ③ Enfin, un dernier phénotype non-conventionnel est observé. Il correspond à une structure où les chromatides sœurs apparaissent l'une à côté de l'autre, comme si un lien physique perdurait entre les deux, malgré la déplétion de la cohésine. Ce phénotype se différencie du « *X-shaped* » par l'absence de constriction centromérique ; il s'agit de « disjonction incomplète » qui reflète une séparation anormale des chromatides sœurs.



Toutes les données présentées dans cette partie des résultats reposent sur l'analyse par étalements chromosomiques de cellules synchronisées en prométaphase par ajout de colchicine et déplétées en RAD21 par ARN interférence. Pour chaque prométaphase analysée, un phénotype, parmi les trois décrits ci-dessus, a été associé. Le pourcentage de prométaphases présentant des disjonctions incomplètes reflète ainsi la proportion de cellules arborant des anomalies de séparation des chromatides sœurs, indépendamment de la voie des cohésine.

La réexpression de la CDA dans des cellules BS réduit le pourcentage de cellules prométaphasiques présentant des disjonctions incomplètes des chromatides sœurs :

Nous avons précédemment montré que les cellules BS présentent une augmentation du pourcentage de cellules prométaphasiques arborant des disjonctions incomplètes des chromatides sœurs (Rouzeau *et al.*, 2012 ; Annexes p.291). Etant donné nos résultats concernant la perte d'expression de la CDA, subséquente de la déficience en BLM, et de son rôle dans certains aspects du phénotype Bloom (Chabosseau *et al.*, 2011 ; Gemble *et al.*, 2015 ; Résultats : partie 1), notre première question était de déterminer qui, de la déficience en BLM ou en CDA, était à l'origine de l'augmentation du pourcentage de cellules BS présentant des disjonctions incomplètes. Pour cela, nous avons analysé l'effet de la réexpression de la CDA dans ces cellules. De manière surprenante, la réexpression d'une protéine CDA exogène dans des cellules BS (BS-CDA, BLM - / CDA +) permet de diminuer le pourcentage de prométaphases présentant des disjonctions incomplètes (67,6% → 49,7%), jusqu'à atteindre le niveau observé dans les cellules exprimant BLM (47,8%) (BS-BLM, BLM + / CDA +) (Figure 63). De plus, la réduction des disjonctions incomplètes est associée à une augmentation des disjonctions complètes (25,6% → 42,8%), ce qui suppose un rétablissement de la séparation correcte des chromatides sœurs.

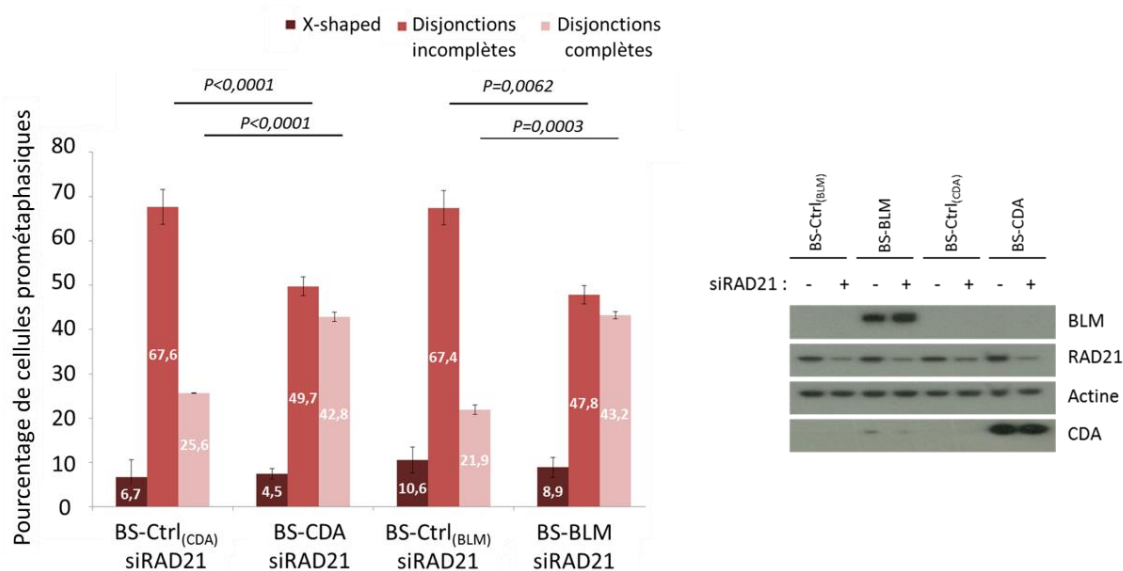


Figure 63 : La réexpression de la CDA dans des cellules BS réduit le pourcentage de cellules prométaphasiques présentant des disjonctions incomplètes des chromatides sœurs.

Panel de gauche - Pourcentage de cellules prométaphasiques présentant un phénotype : « X-shaped » (en rouge foncé), disjonction incomplète (en rouge) ou disjonction complète (en rouge clair) dans les lignées indiquées, transfectées par un siRNA spécifique de RAD21 (n=5 ; > 500 prométaphases analysées). Panel de droite - Immunoblot représentatif de l'expression de RAD21 dans les lignées indiquées, transfectées ou non par un siRNA spécifique de RAD21. Les barres d'erreurs représentent la moyenne \pm l'écart-type. La significativité a été calculée avec le test t de Student.

Ce premier résultat suggère donc que c'est la déficience en CDA qui est à l'origine de l'augmentation de la fréquence des cellules BS présentant des disjonctions incomplètes.

La déplétion de PICH dans des cellules exprimant la CDA induit une augmentation de la fréquence des cellules présentant des disjonctions incomplètes :

Nous avons également montré que la déplétion de la protéine PICH par ARN interférence dans des cellules BS complémentées avec une protéine BLM fonctionnelle (BLM + / CDA +) induit une augmentation du pourcentage de disjonctions incomplètes (Rouzeau *et al.*, 2012 ; Annexes p.291). De manière attendue, la déplétion de PICH, selon le même protocole, dans des cellules exprimant uniquement la CDA (BS-CDA, BLM - / CDA +), entraîne également une augmentation des prométaphases présentant des disjonctions incomplètes (53,0 % → 69,7%) (Figure 64). Celle-ci est associée à une diminution des disjonctions complètes (38,0% → 19,3%), ce qui reflète la réduction de la séparation correcte des chromatides sœurs (Figure 64). Cela suggère que PICH est nécessaire pour une disjonction correcte des chromatides sœurs dans les cellules exprimant la CDA, indépendamment du statut de BLM.

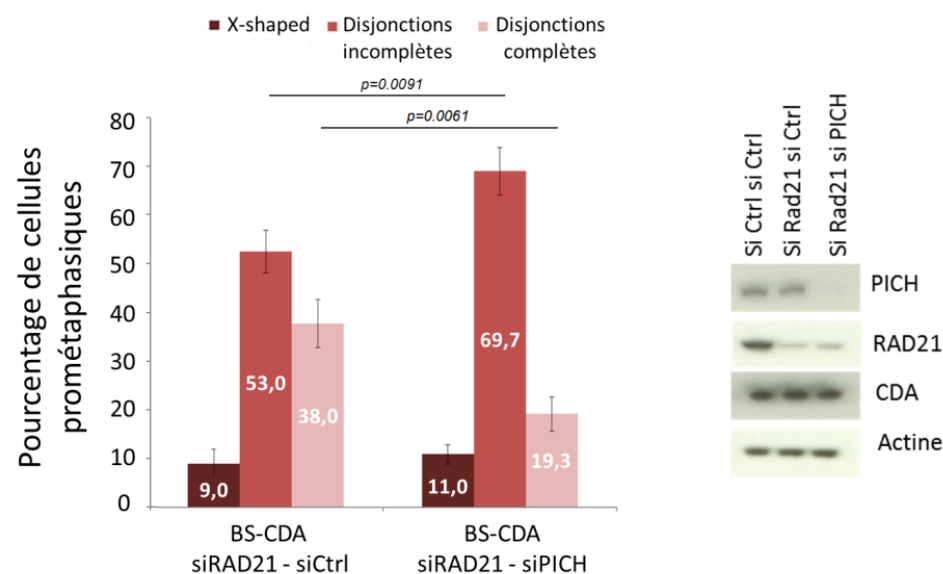


Figure 64 : La déplétion de PICH dans des cellules exprimant la CDA induit une augmentation de la fréquence des cellules présentant des disjonctions incomplètes.

Panel de gauche - Pourcentage de cellules prométaphasiques présentant un phénotype : « X-shaped » (en rouge foncé), disjonction incomplète (en rouge) ou disjonction complète (en rouge clair) dans les lignées BS-Ctrl_(CDA) et BS-CDA, transfectées par les siRNAs indiqués (n=3 ; > 300 prométaphases analysées). Panel de droite - Immunoblot représentatif de l'expression de RAD21 et de PICH dans les lignées BS-Ctrl_(CDA) et BS-CDA, transfectées par les siRNAs indiqués. Les barres d'erreurs représentent la moyenne ± l'écart-type. La significativité a été calculée avec le test t de Student.

De plus, nous avons observé que la déplétion de PICH dans des cellules BS (BLM - / CDA -) ne conduit pas à une augmentation supplémentaire du pourcentage de disjonctions incomplètes (Rouzeau *et al.*, 2012 ; Annexes p.291), ce qui suggère que PICH et la CDA agissent de manière épistatique pour favoriser la séparation adéquate des chromatides sœurs.

La réactivation de PARP-1 prévient l'augmentation de la fréquence de cellules prométaphasiques présentant des disjonctions incomplètes dans des cellules déplétées en CDA :

Afin de confirmer l'importance de l'expression de la CDA dans la prévention d'une disjonction incomplète des chromatides sœurs, nous avons réalisé des étalements chromosomiques de cellules HeLa exprimant BLM de manière endogène et déplétées ou non en CDA par ARN interférence (HeLa-Ctrl_(CDA), BLM + / CDA + et HeLa-shCDA, BLM + / CDA -). Comme attendu, la déplétion de la CDA par expression stable d'un shRNA spécifique de cette dernière, induit une augmentation du pourcentage de prométaphases présentant des disjonctions incomplètes (41,3% → 55,8%), associée à une diminution des disjonctions complètes (52,6% → 40,1%), ce qui reflète la réduction de la séparation correcte des chromatides sœurs (Figure 65). Ces données corroborent les observations faites dans les cellules BS et confirment, dans un autre modèle cellulaire, l'importance de la CDA pour prévenir la disjonction incomplète des chromatides sœurs.

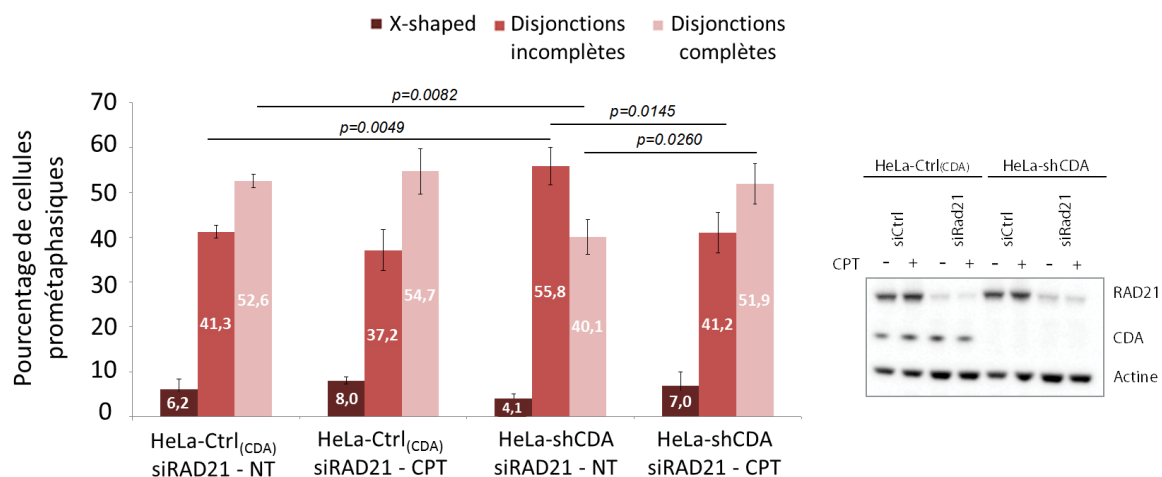


Figure 65 : La réactivation de PARP-1 prévient l'augmentation de la fréquence de cellules prométaphasiques présentant des disjonctions incomplètes dans des cellules déplétées en CDA.

Panel de gauche - Pourcentage de cellules prométaphasiques présentant un phénotype : « X-shaped » (en rouge foncé), disjonction incomplète (en rouge) ou disjonction complète (en rouge clair) dans les lignées indiquées, transfectées par un siRNA spécifique de RAD21 et traitées ou non avec 2 pM de CPT pendant 8 h (n=3 ; > 300 prométaphases analysées). Panel de droite - Immunoblot représentatif de l'expression de RAD21 dans les lignées indiquées, transfectées ou non par un siRNA spécifique de RAD21 et traitées ou non avec 2 pM de CPT pendant 8 h. Les barres d'erreurs représentent la moyenne ± l'écart-type. La significativité a été calculée avec le test t de Student.

Nous avons montré que l'augmentation de la fréquence des UFBs associée à la déficience en CDA s'explique par la diminution de l'activité basale de PARP-1 (Gemble *et al.*, 2015 ; Résultats : partie 1). Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle la réduction de l'activité de PARP-1 en absence de la CDA pourrait également être à l'origine de la disjonction incomplète des chromatides sœurs. Etant donné que l'ajout de 2 pM de CPT permet de réactiver PARP-1, prévenant ainsi la formation des UFBs en absence de la CDA (Gemble *et al.*, 2015 ; Résultats : partie 1), nous avons testé l'effet de ce même traitement sur la séparation des chromatides. Ainsi, l'ajout de 2 pM de CPT pendant 8 h à des cellules déplétées en CDA, permet de diminuer le pourcentage de prométaphases présentant des disjonctions incomplètes (55,8% → 41,1%), jusqu'à revenir au niveau observé dans les cellules exprimant la CDA (41,3%), tout en augmentant les disjonctions complètes (40,1% → 51,9%) (Figure 65). Ce résultat suggère que la réduction de l'activité de PARP-1 est responsable de l'augmentation du pourcentage de cellules prométaphasiques présentant des disjonctions partielles des chromatides sœurs observée dans les cellules déficientes en CDA.

La déplétion de PARP-1 entraîne une augmentation du pourcentage de cellules présentant des disjonctions incomplètes, reproduisant le phénotype des cellules déplétées en CDA :

Dans le but de confirmer l'implication de PARP-1 dans l'augmentation de la proportion de prométaphases présentant des chromatides partiellement disjointes, nous avons réalisé des étalements chromosomiques de cellules exprimant la CDA mais déplétées ou non en PARP-1 (HeLa-Ctrl_(PARP-1), CDA + / PARP-1 + et HeLa-shPARP-1, CDA + / PARP-1 -). La déplétion de PARP-1, grâce à l'expression stable d'un shRNA spécifique de cette dernière, conduit à une augmentation des prométaphases présentant des disjonctions incomplètes (39,0% → 62,0%), corrélée à une diminution des disjonctions complètes (39,8% → 18,8%), ce qui reflète la réduction de la séparation correcte des chromatides sœurs (Figure 66).

La déplétion de PARP-1 est donc suffisante pour augmenter la proportion de cellules présentant des disjonctions incomplètes, même lorsque la CDA est exprimée (Figure 66). A l'inverse, la réactivation de PARP-1 dans des cellules déficientes en CDA prévient la disjonction partielle des chromatides sœurs (Figure 65). Nos données démontrent donc que la réduction de l'activité de PARP-1 dans les cellules déficientes en CDA est à l'origine des défauts de séparation des chromatides sœurs observés dans ces lignées. Nos résultats soulèvent ainsi le rôle primordial de l'activité de PARP-1 dans la prévention de la séparation incorrecte des chromatides sœurs avant l'anaphase.

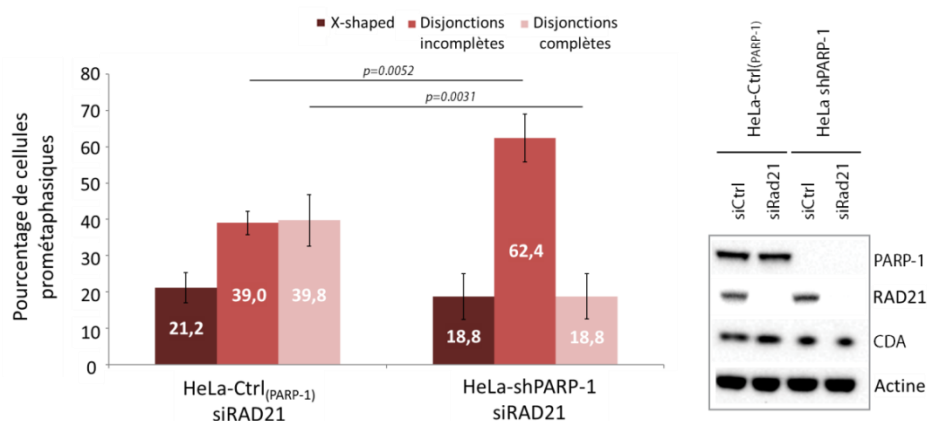


Figure 66 : La déplétion de PARP-1 entraîne une augmentation du pourcentage de cellules présentant des disjonctions incomplètes.

Panel de gauche - Pourcentage de cellules prométaphasiques présentant un phénotype : « X-shaped » (en rouge foncé), disjonction incomplète (en rouge) ou disjonction complète (en rouge clair) dans les lignées indiquées, transfectées par un siRNA spécifique de RAD21 (n=3 ; > 230 prométaphases analysées). Panel de droite - Immunoblot représentatif de l'expression de RAD21 dans les lignées indiquées, transfectées ou non par un siRNA spécifique de RAD21. Les barres d'erreurs représentent la moyenne \pm l'écart-type. La significativité a été calculée avec le test t de Student.

L'inhibition de Chk1 promeut la disjonction incomplète des chromatides sœurs :

Nous avons montré que la réduction de l'activité de PARP-1 dans les cellules déficientes en CDA compromet l'activation optimale de Chk1 ce qui réduit l'efficacité des points de contrôle qu'elle régule et favorise la formation des UFBs (Résultats : partie 2). Etant donné que l'augmentation de la fréquence des cellules présentant des disjonctions incomplètes des chromatides sœurs résulte aussi de la réduction de l'activité de PARP-1, nous nous sommes posé la question de savoir si cette séparation partielle pourrait également être dépendante de l'activité de Chk1. Pour cela, nous avons inhibé l'activité de Chk1 par un traitement de 8h avec 400 nM de CHIR-124 dans des cellules exprimant la CDA. Nous avons observé une augmentation du pourcentage de prométaphases présentant des disjonctions incomplètes (40,1% \rightarrow 62,2%), reproduisant l'augmentation obtenue après déplétion de la CDA (40,1% \rightarrow 59,8%) (Figure 67). En revanche, l'inhibition de Chk1 dans des cellules n'exprimant pas la CDA n'affecte pas le pourcentage de prométaphases présentant des disjonctions incomplètes, suggérant donc que Chk1 et la CDA agissent de manière épistatique pour prévenir la disjonction partielle des chromatides sœurs.

Ces résultats soulignent l'importance de l'activité de Chk1 dans la prévention de la séparation incomplète des chromatides sœurs en absence de cohésine. Il est par ailleurs intéressant de noter le parallèle entre disjonctions incomplètes des chromatides sœurs et formation d'UFBs surnuméraires

qui suggère que l'accumulation d'ADN non répliqué en mitose (Gemble *et al.*, 2015 ; Résultats : parties 1 & 2) pourrait également être à l'origine de disjonctions incomplètes des chromatides sœurs. Nous avons par conséquent émis l'hypothèse selon laquelle la disjonction incomplète des chromatides pourrait être un marqueur de la présence de séquences d'ADN non répliquées perdurant en mitose. Cependant, nous avons constaté que de manière remarquable, la disjonction incomplète des chromatides sœurs suivait une loi du « tout ou rien », toutes les chromatides sœurs d'une même cellule, ou aucune, présentant une disjonction incomplète. Ce constat, très évocateur d'un mécanisme de point de contrôle, sera largement abordé dans le chapitre « Discussion ».

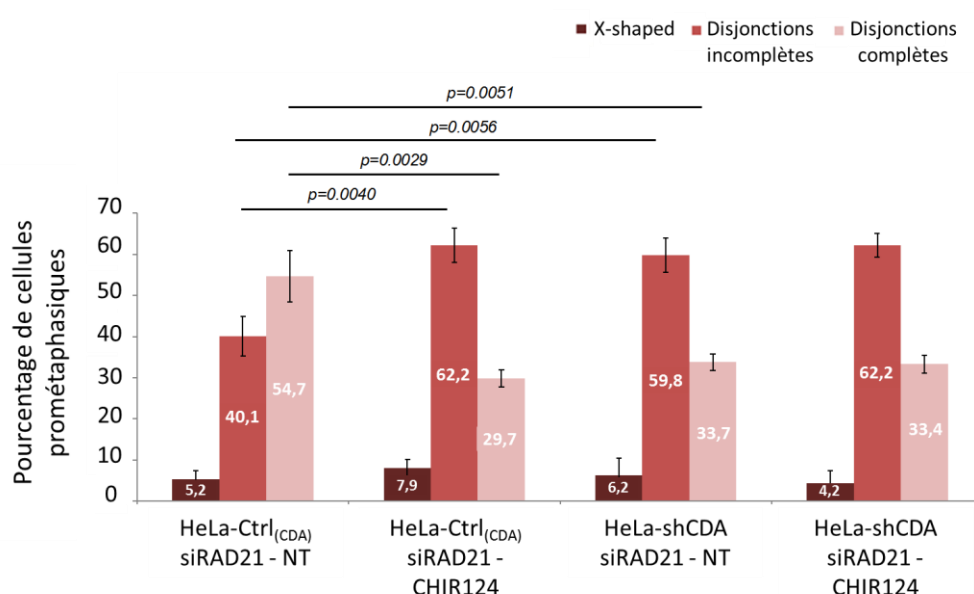


Figure 67 : L'inhibition de Chk1 promeut la disjonction incomplète des chromatides.

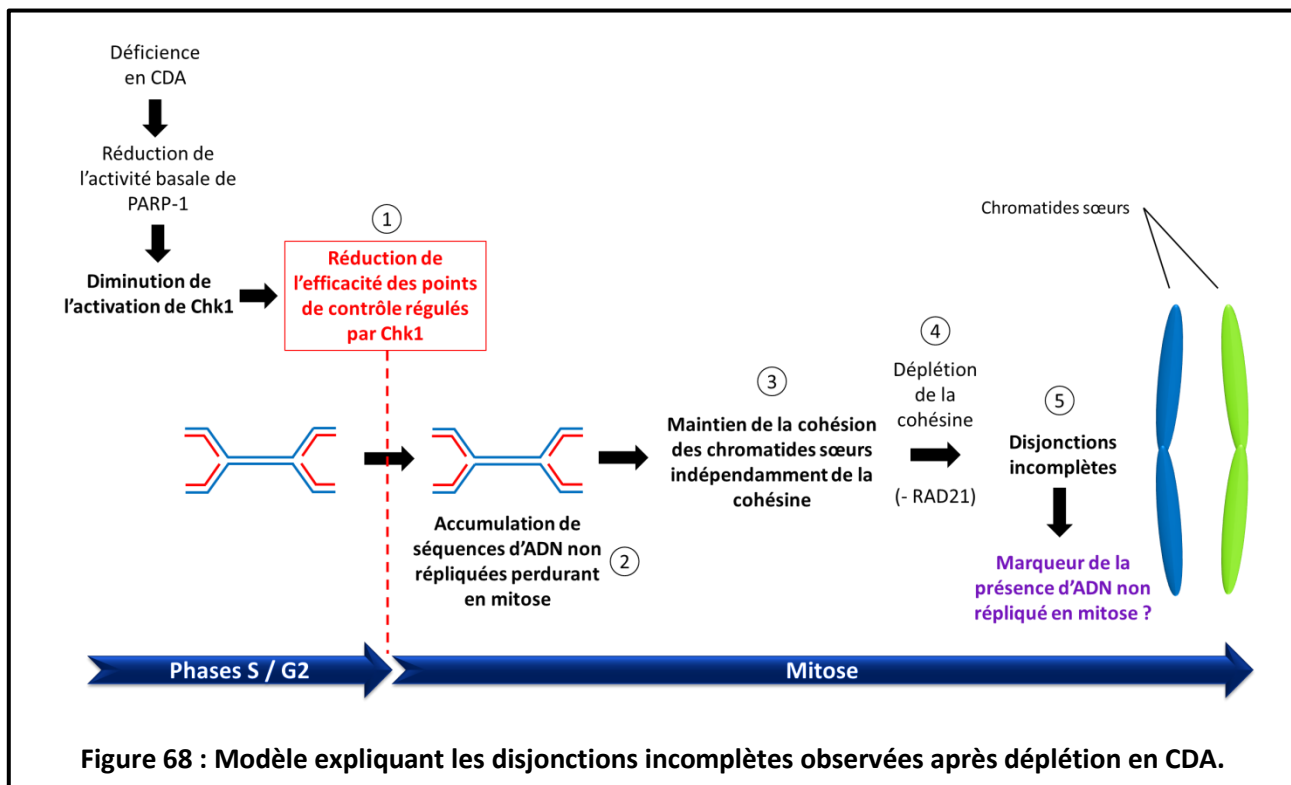
Pourcentage de cellules prométaphasiques présentant un phénotype : « X-shaped » (en rouge foncé), disjonction incomplète (en rouge) ou disjonction complète (en rouge clair) dans les lignées indiquées, transfectées par un siRNA spécifique de RAD21 et traitées ou non avec 400 nM de CHIR124 pendant 8 h ($n=3$; > 240 prométaphases analysées). Les barres d'erreurs représentent la moyenne \pm l'écart-type. La significativité a été calculée avec le test t de Student.

En résumé, les principaux résultats de cette étude démontrent que :

- ❶ La déficience en CDA conduit à une augmentation de la fréquence des disjonctions partielles des chromatides sœurs en absence de cohésine.
- ❷ Cette disjonction incomplète résulte de la diminution de l'activité de PARP-1 qui perturbe l'activation optimale de Chk1.

③ La disjonction incomplète des chromatides sœurs en absence de la CDA serait un marqueur de l'accumulation de séquences d'ADN non répliquées perdurant en mitose.

En nous basant sur ces données, nous avons proposé le modèle suivant : ① La déficience en CDA conduit à une réduction de l'efficacité des points de contrôle régulés par Chk1, ce qui favorise ② l'accumulation de séquences d'ADN non répliquées perdurant en mitose. ③ La présence d'ADN non répliqué au moment de l'entrée en mitose induit le maintien de la cohésion des chromatides sœurs, indépendamment de la cohésine. Ce maintien de la cohésion entre les chromatides est révélé par ④ la déplétion de la cohésine dans des cellules en prométaphase se traduisant ⑤ par la disjonction incomplète des chromatides sœurs (Figure 68).



4

Résultats non publiés :

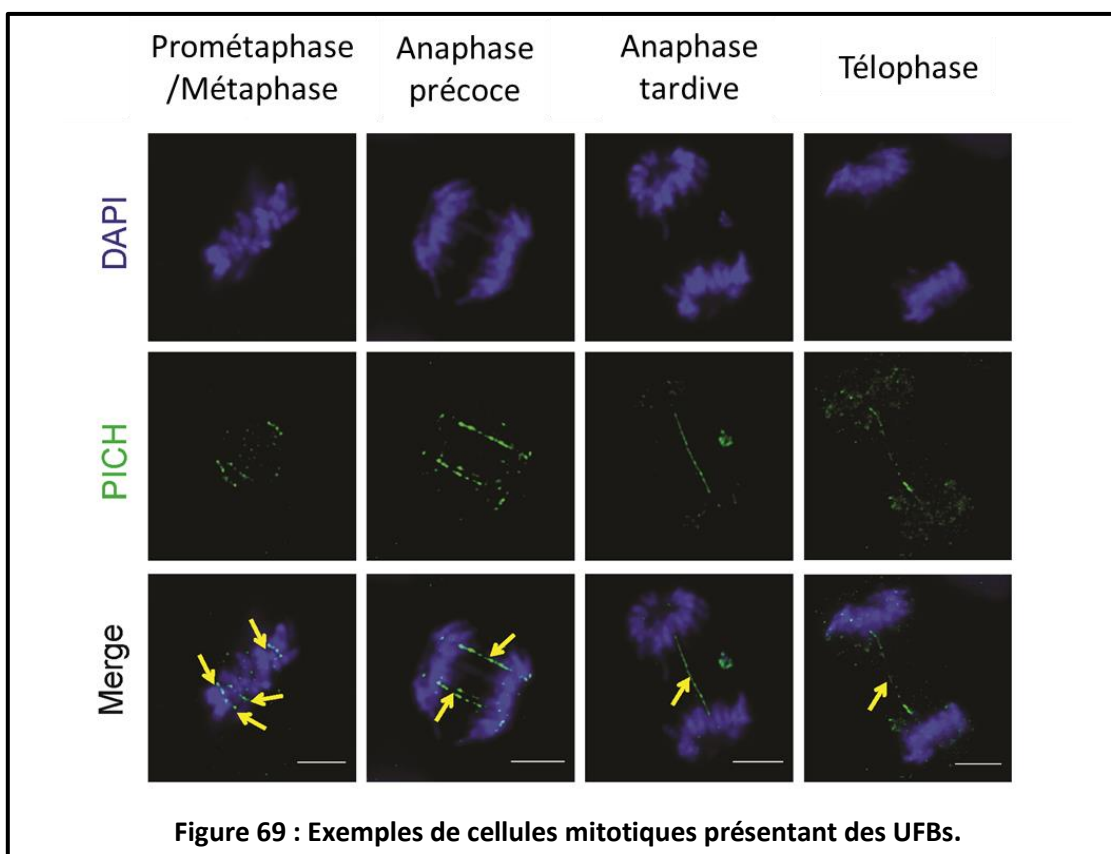
**BLM et résolution des UFBs au cours
de la progression mitotique**

BLM et résolution des UFBs au cours de la progression mitotique

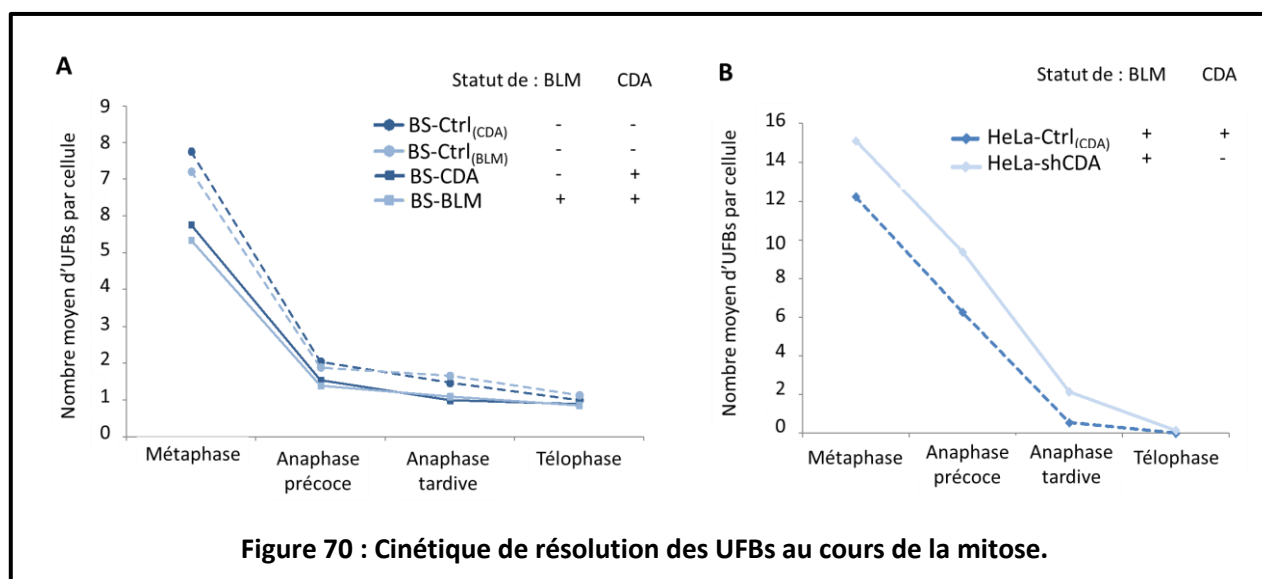
Gemble S, Buhagiar-Labarchède G, Onclercq-Delic R, Amor-Guérét M.

Comme évoqué dans la section « Présentation du projet de recherche » p.161, il a été proposé que l'augmentation de la fréquence des UFBs dans les cellules BS serait due à leur non résolution du fait de l'absence d'une protéine BLM fonctionnelle (Chan et al., 2007). Cependant, nos résultats démontrent que l'augmentation de la fréquence des UFBs dans ces cellules n'est pas directement liée à la perte d'expression de BLM mais résulte de la déficience en CDA et du déséquilibre du pool de pyrimidines subséquent (Gemble et al., 2015 ; Résultats : partie 1).

Les résultats obtenus au cours de la première partie de ma thèse remettent en question le rôle de BLM proposé dans la résolution des UFBs. Ainsi, afin de nous assurer de l'absence directe d'implication de l'activité hélicase de BLM dans la résolution de ces structures, nous avons analysé la fréquence des UFBs au cours de la progression mitotique (ce qui reflète leur résolution) (Figure 69), en fonction de l'expression de la CDA ou de BLM.



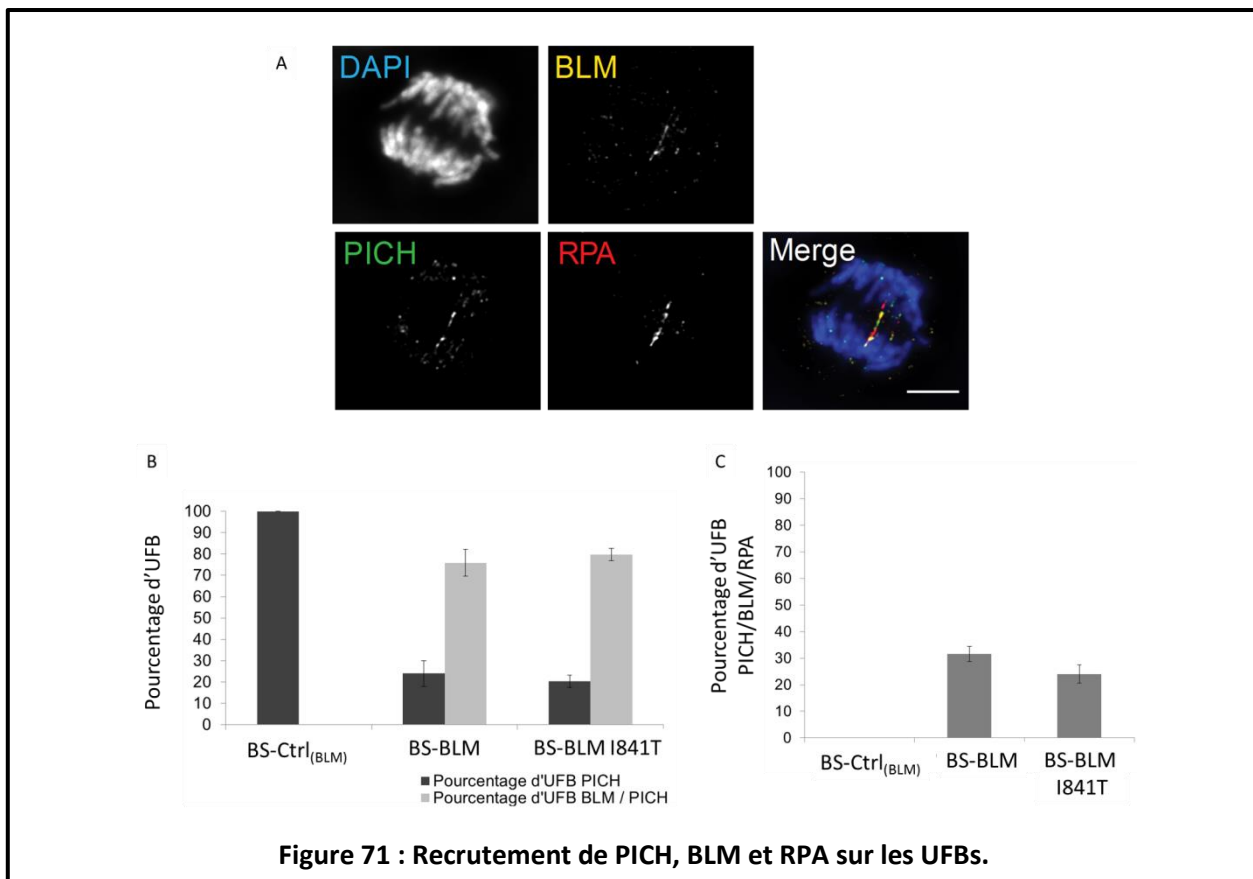
Comme attendu, les cellules n'exprimant pas la CDA présentent une augmentation de la fréquence des UFBs et ceci, dès la métaphase (Figure 70A-B), confirmant ainsi que la formation des UFBs en absence de la CDA résulte vraisemblablement d'anomalies ayant lieu avant l'entrée en mitose. Cependant, la cinétique de résolution des UFBs au cours de la progression mitotique (pente de la courbe) ne semble pas affectée en fonction de l'expression de la CDA ou de BLM (Figure 70A-B). Ces résultats suggèrent que BLM n'est soit pas impliquée dans la résolution des UFBs au cours de la mitose, soit qu'un mécanisme alternatif ne nécessitant pas BLM prend le relais en son absence.



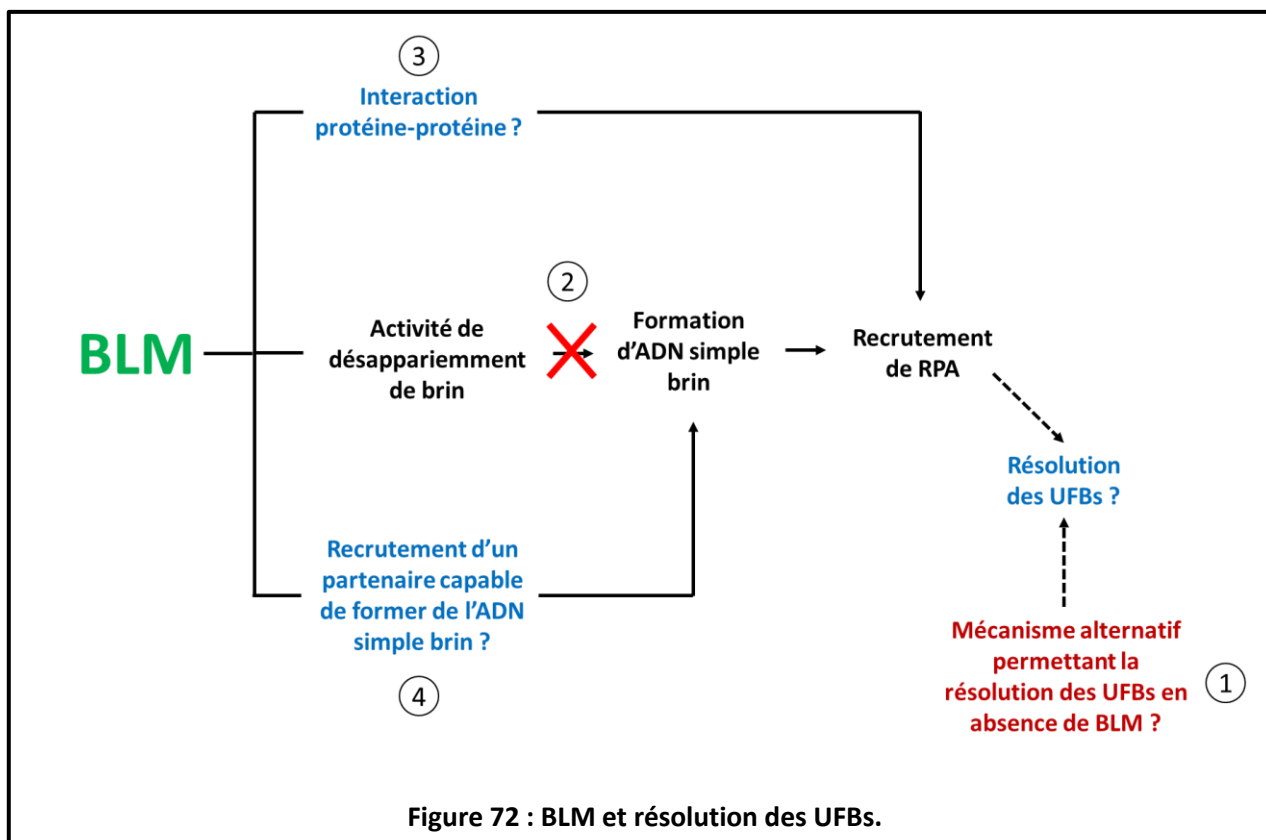
De manière intéressante, la comparaison de la courbe obtenue dans des fibroblastes BS (Figure 70A) avec celle obtenue dans des lignées HeLa (Figure 70B) révèle les spécificités pouvant exister entre les lignées cellulaires. En effet, les cellules HeLa présentent un nombre moyen plus élevé d'UFBs par rapport aux cellules BS. De plus, la résolution de la majorité des UFBs semble se faire entre la métaphase et l'anaphase précoce dans les fibroblastes BS, alors qu'elle semble plutôt avoir lieu entre la métaphase et l'anaphase tardive dans les lignées HeLa (Figure 70A et B).

Nous avons ensuite cherché à définir le rôle du recrutement de BLM sur les UFBs. Il a été proposé que la présence de BLM sur les UFBs permettrait de générer de l'ADNsb grâce à l'activité de désappariement de brins de cette dernière, ce qui entraînerait le recrutement subséquent de RPA et initierait la résolution de ces structures par la Topo III α (Liu *et al.*, 2014). Afin de tester cette hypothèse nous avons analysé le recrutement de BLM et de RPA sur les UFBs dans des cellules BS complémentées avec une protéine BLM fonctionnelle (BS-BLM) ou mutée pour son activité hélicase (BS-BLM I841T). En accord avec les données de la littérature (Baumann *et al.*, 200 ; Chan *et al.*, 2007 ; Ke *et al.*, 2011), les UFBs présentant un marquage BLM sont également tous marqués par PICH, confirmant que la présence de cette dernière est nécessaire au recrutement de BLM sur les UFBs

(Figure 71A et B). En outre, la présence de RPA sur les UFBs est bien dépendante de celle de BLM (Figure 71B), corroborant les données de la littérature (Chan *et al.*, 2009). Étonnamment, la perte d'activité hélicase de BLM n'altère pas son recrutement sur les UFBs (Figure 71C) et ne modifie pas significativement le recrutement subséquent de RPA (Figure 71C). Ce résultat suggère que, contrairement à ce qui a été proposé, l'activité de désappariement de brins de BLM n'est donc pas nécessaire au recrutement de RPA sur les UFBs.



En conclusion, nos résultats montrent que ① l'absence de BLM n'affecte pas la résolution des UFBs, suggérant ainsi que cette dernière n'est, soit pas impliquée dans la résolution de ces structures au cours de la progression mitotique, soit qu'un mécanisme alternatif prend le relais en absence de BLM. Étonnamment, ② l'activité hélicase de BLM n'est pas nécessaire au recrutement de RPA sur les UFBs, discréditant ainsi l'hypothèse selon laquelle l'activité de désappariement de brin de BLM serait impliquée dans la formation d'ADN simple brin. ③ BLM pourrait alors recruter directement RPA via une interaction protéine-protéine ou bien ④ permettre le recrutement d'un partenaire capable d'induire la formation d'ADN simple brin favorisant ensuite le recrutement subséquent de RPA (Figure 72).



Les autres travaux auxquels j'ai participé, mais qui ne sont pas en lien direct avec le sujet de ma thèse, sont regroupés dans la section « Annexe ; Partie : Listes de mes autres articles scientifiques sans lien direct avec mon sujet de thèse et résumés associés » p. 307.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION

Au cours de ce projet, nous avons pu identifier des conséquences encore inconnues d'un déséquilibre du pool de nucléotides. En effet, l'accumulation intracellulaire de dCTP due à la déficience en CDA, réduit l'activité basale de PARP-1, compromettant l'efficacité des points de contrôle dépendants de Chk1. Cela entraîne un excès de séquences d'ADN non répliquées perdurant en mitose où elles seront à l'origine de la formation d'UFBs surnuméraires lors de la séparation des chromatides sœurs.

Régulation de l'activité de PARP-1 par la dCTP

Les résultats obtenus au cours de ma thèse ont permis d'identifier une nouvelle conséquence de l'altération du métabolisme des nucléotides : la déficience en CDA conduit à une accumulation intracellulaire de dCTP qui entraîne une diminution de l'activité basale de PARP-1 *in vivo*.

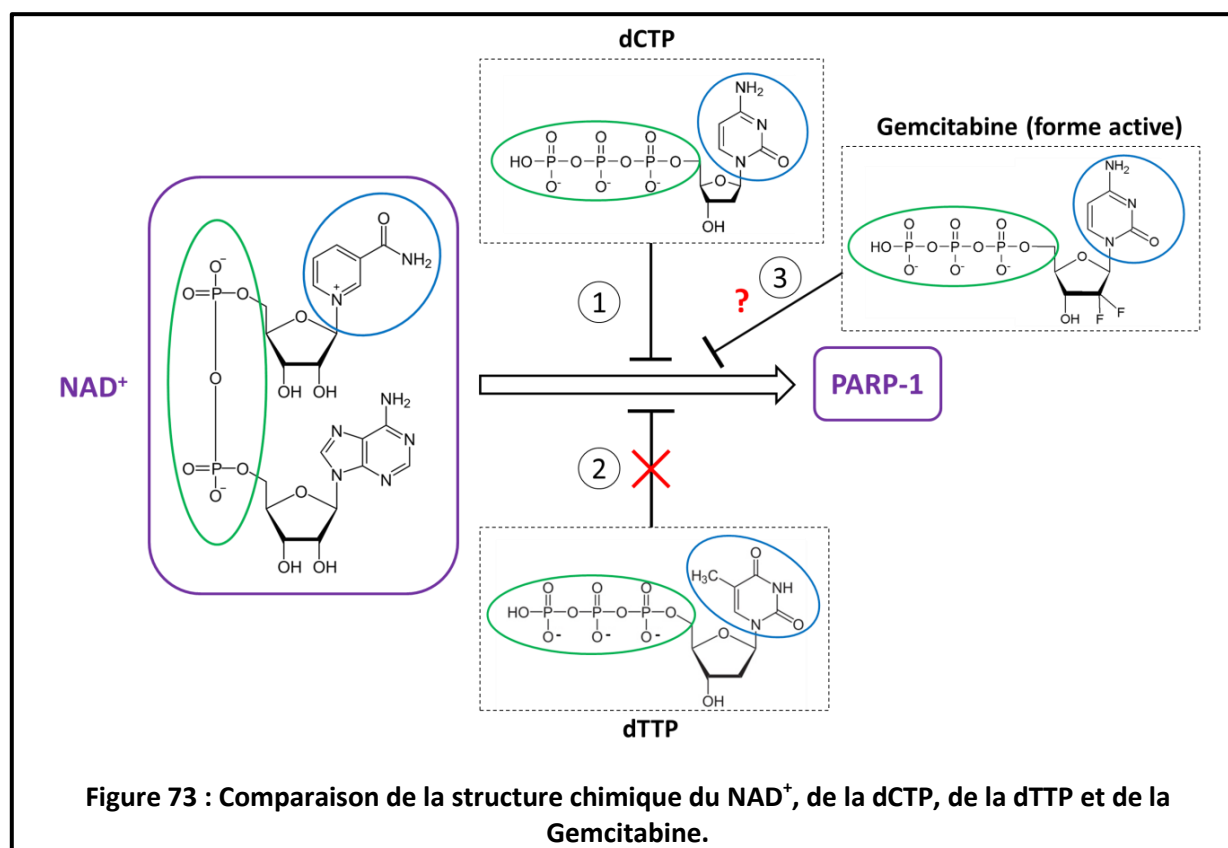
Nos données montrent que l'ajout de dC au milieu de culture de cellules exprimant la CDA permet de reproduire l'accumulation de dCTP et la diminution de l'activité de PARP-1 observées dans les cellules déficientes en CDA. Nous avons donc proposé que l'accumulation intracellulaire de dCTP pourrait être à l'origine de la réduction de l'activité basale de PARP-1 observée dans les cellules n'exprimant pas la CDA. En accord avec cette hypothèse, l'ajout de dCTP en présence de la protéine PARP-1 recombinante conduit à une diminution de l'activité *in vitro* de cette dernière, suggérant que la dCTP est capable d'inhiber directement l'activité de PARP-1. De plus, étant donné que l'ajout de NAD⁺ permet de lever l'effet inhibiteur de la dCTP sur PARP-1 cela laisse envisager une compétition entre les deux molécules pour la fixation sur son site actif (① de la figure 73).

Bien que nos résultats démontrent que la dCTP est capable d'inhiber PARP-1 *in vitro*, la concentration nécessaire pour obtenir cet effet est très élevée, de l'ordre de la dizaine de millimolaires. De plus, cette inhibition est levée par l'ajout de concentrations faibles de NAD⁺ de l'ordre de la centaine de micromolaires. Ces données suggèrent que l'affinité de la dCTP pour PARP-1 *in vitro* est très inférieure à celle du NAD⁺, soulevant ainsi la question de la capacité de la dCTP à gêner la fixation du NAD⁺ sur PARP-1 dans des conditions physiologiques. En effet, la concentration

intracellulaire de dCTP dans des cellules HeLa est de l'ordre de la centaine de micromolaires (Zhang et Mathews, 1995) alors que la concentration de NAD^+ varie autour du millimolaire (Lin et Guarente, 2003). Cela implique un ratio entre dCTP et NAD^+ très en faveur de ce dernier, excluant dans ces conditions, la possibilité que la dCTP puisse entrer en compétition avec le NAD^+ , beaucoup plus affin pour PARP-1. Cependant, des concentrations locales de NAD^+ et de dCTP pourraient expliquer l'effet *in vivo* de la dCTP sur l'activité de PARP-1. Par exemple, la protéine NMNAT-1, impliquée dans la voie de biosynthèse du NAD^+ (cf. Figure 42 p.134), est directement recrutée au niveau de certains promoteurs via son interaction avec PARP-1 ou avec Sirt1 (Zhang *et al.*, 2009 ; Zhang *et al.*, 2012). Ce recrutement permettrait la synthèse locale de NAD^+ , constituant un pool de NAD^+ utilisé pour l'activité de PARP-1 ou de Sirt1. D'autres études ont également montré que les protéines RNR et TMPK, participant au métabolisme des nucléotides, sont directement recrutées aux sites de dommages de l'ADN (cf. Figure 24 p.82) (Niida *et al.*, 2010 ; Hu *et al.*, 2012), créant sans doute un pool de nucléotides local utilisé par les enzymes de réparation. Ces exemples d'observation de pool de NAD^+ et de pool de nucléotides locaux pourraient permettre d'expliquer la capacité de la dCTP à inhiber l'activité de PARP-1 *in vivo*. Cependant, la mise en évidence d'un tel mécanisme reste complexe du fait des limitations techniques actuelles qui ne permettent pas de mesurer facilement des concentrations locales de NAD^+ et de nucléotides.

Malgré la nécessité d'utiliser des concentrations élevées de dCTP, celle-ci est néanmoins le seul dNTP capable d'inhiber PARP-1 *in vitro*, probablement en entrant en compétition avec le NAD^+ pour la fixation sur PARP-1. Si tel est le cas, cette observation suggère que la dCTP possède une structure chimique particulière par rapport aux autres dNTPs, mais comparable au NAD^+ , permettant son interaction avec le site actif de PARP-1. La comparaison des structures de la dCTP et du NAD^+ montre qu'elles possèdent effectivement toutes les deux des groupements phosphates (en vert, figure 73) ainsi qu'un hétérocycle à 6 atomes (en bleu, figure 73), une pyridine pour le NAD^+ et une pyrimidine pour la dCTP, comprenant respectivement un ou deux hétéroatomes. L'hétérocycle de la dCTP et les groupements qu'il comporte semblent importants puisque la comparaison de sa structure à celle de la dTTP, une pyrimidine qui n'inhibe pas PARP-1 *in vitro* (② de la figure 73), montre que ces deux molécules diffèrent uniquement par ces groupements (en bleu, figure 73). Ainsi, la capacité de la dCTP à se fixer sur PARP-1 pourrait être liée à son hétérocycle et aux groupements associés. Nous ne pouvons néanmoins pas exclure la possibilité que l'inhibition *in vivo* et *in vitro* de PARP-1 par la dCTP soit due à un produit dérivé de la dCTP : ces hypothèses sont en cours d'étude en collaboration avec les chimistes de l'Institut Curie (Florence Mahuteau-Betzer, Institut Curie, UMR176, Orsay), la plateforme de spectrométrie de masse de l'Institut Curie (Damarys Loew, Institut Curie, Paris), et la

plateforme de RMN de Gif sur Yvette (Carine van Heijenoort, Département de Chimie et Biologie Structurales et Analytiques, ICSN).



Il est surprenant de constater qu'en plus de diminuer l'activité de PARP-1, la déficience en CDA réduit également son recrutement à la chromatine. Ce résultat est d'autant plus étonnant que l'inhibition de PARP-1 n'affecte généralement pas son recrutement à l'ADN mais plutôt sa dissociation de celui-ci qui est dépendante de la synthèse de PAR et en particulier de l'auto-PARYlation de PARP-1. Il a en effet été proposé que la dissociation de PARP-1 de l'ADN pourrait soit être liée aux charges négatives portées par le PAR qui seraient à l'origine d'une répulsion entre PARP-1 PARYlée et l'ADN, soit au fait que le site de fixation à l'ADN de PARP-1 se retrouverait masqué par le PAR entraînant sa dissociation de l'ADN (D'Amours *et al.*, 1999 ; Kim *et al.*, 2004 ; Petesch et Lis, 2008 ; Tulin et Spradling, 2003 ; Wacker *et al.*, 2007). L'inhibition de PARP-1 et de la synthèse subséquente de PAR ont donc plutôt tendance à piéger cette dernière au niveau de l'ADN en bloquant sa dissociation (pour revue : Shen *et al.*, 2015). Il est néanmoins possible d'expliquer pourquoi PARP-1 est moins présente à la chromatine en absence de la CDA selon un mécanisme similaire à ce qui a été proposé pour sa dissociation dépendante du PAR. En effet, la dCTP possède trois phosphates chargés négativement ; sa fixation sur PARP-1 pourrait donc induire une répulsion avec l'ADN, l'ADN possédant lui aussi des charges négatives. Cet effet de répulsion limiterait alors la

fixation du couple PARP-1/dCTP sur l'ADN expliquant pourquoi celle-ci est moins présente au niveau de la chromatine en absence de la CDA. Il est également possible que les phosphates de la dCTP masquent le site de fixation à l'ADN de PARP-1, restreignant ainsi le recrutement de cette dernière sur l'ADN. Quel que soit le mécanisme, cette observation est particulièrement intéressante car elle suggère que la dCTP pourrait affecter l'activité de PARP-1 selon deux mécanismes : ❶ en limitant son recrutement à l'ADN, nécessaire à son activation, et ❷ en empêchant la fixation du NAD⁺.

L'inhibition partielle de PARP-1 par la dCTP soulève aussi la question de l'effet des analogues de nucléosides (ANs) dérivés de la cytidine sur son activité. Comme expliqué plus tôt dans ce manuscrit, lors de leur entrée dans la cellule les ANs subissent une série de phosphorylations, catalysée par des protéines cellulaires, afin de leur ajouter trois phosphates et permettre leur intégration dans l'ADN (Jordheim *et al.*, 2013). Ainsi, les formes actives de ces ANs, en particulier l'AraC ou la gemcitabine qui présentent un hétérocycle inchangé par rapport à la cytidine (*cf. Figure 29, p.104*), possèdent des structures très similaires à la dCTP. Celles-ci pourraient par conséquent leur permettre d'inhiber l'activité de PARP-1 en gênant la fixation du NAD⁺ selon un mécanisme similaire à la dCTP (❸ de la figure 73). Cela suggère qu'une partie des effets observés lors des traitements basés sur l'utilisation de ces ANs pourrait être la conséquence d'une réduction de l'activité de PARP-1. Afin de déterminer le potentiel inhibiteur des ANs dérivés de cytidine sur PARP-1, il serait intéressant de tester l'effet de l'ajout de certaines de ces molécules sur l'activité de PARP-1 *in vitro* et *in vivo*, selon une approche similaire à celle utilisée pour la dCTP.

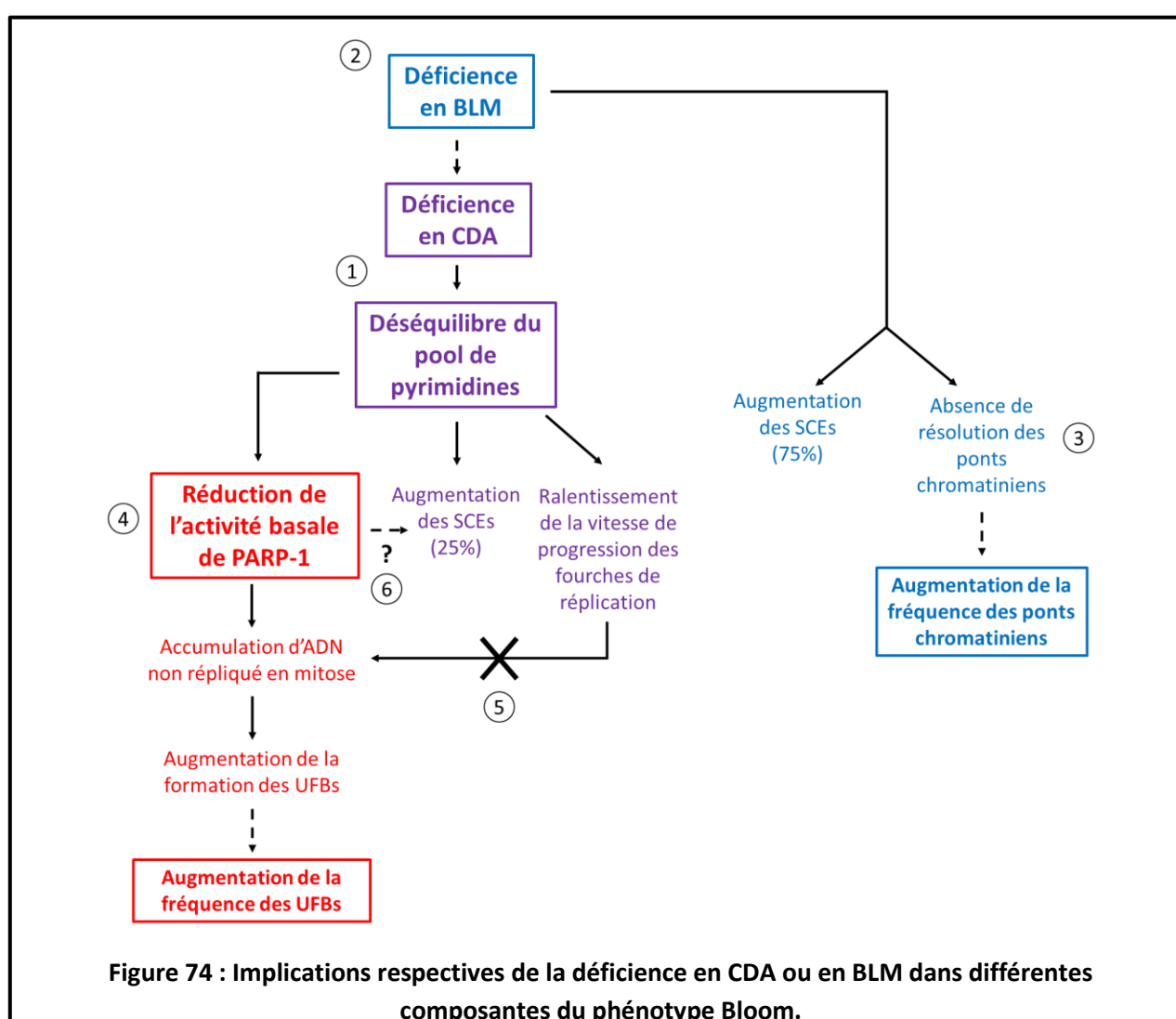
En conclusion, nos travaux ont permis d'identifier la dCTP comme étant un régulateur de l'activité de PARP-1, révélant un lien inédit entre le pool de nucléotides et PARP-1.

PARP-1 et phénotype Bloom

La diminution de l'activité de PARP-1 en absence de la CDA se traduit par des conséquences fonctionnelles qui expliquent l'augmentation de la fréquence des UFBs, mais pas celles des ponts chromatinien, dans les cellules déficientes en hélicase BLM.

Nos résultats ont permis d'identifier pour la première fois une diminution de l'activité de PARP-1 dans les cellules BS, celle-ci étant à l'origine d'au moins un aspect du phénotype Bloom. En effet, nous avons démontré que l'augmentation de la fréquence des UFBs dans les cellules BS est strictement dépendante de la déficience en CDA et de la réduction de l'activité de PARP-1 qui en

découle (① de la figure 74). En revanche, l'augmentation des ponts chromatinien est entièrement due à la déficience en BLM *per se* (② de la figure 74). Ces résultats démontrent que ces anomalies mitotiques possèdent deux origines moléculaires bien distinctes et confirment que la formation des UFBs ne résulte pas de la résolution des ponts chromatinien, contrairement à ce qui a été proposé par Ke *et al.*, en 2011 (*cf. section : « Présentation du projet de recherche » p.161*). Ainsi, l'augmentation du nombre de ponts chromatinien dans les cellules BS pourrait être la conséquence de l'absence de leur résolution par BLM, comme cela avait été initialement proposé (Chan *et al.*, 2007) (③ de la figure 74). En revanche, l'augmentation de la fréquence des UFBs ne résulte pas d'un défaut de résolution mais d'une stimulation des mécanismes à l'origine de leur formation (④ de la figure 74) (*cf. section suivante*).



La diminution de l'activité basale de PARP-1 en absence de la CDA a également permis de caractériser une nouvelle conséquence du déséquilibre du pool de nucléotides sur la réplication. En

effet, la capacité du pool de nucléotides à affecter la réplication a été principalement associée au ralentissement de la vitesse de progression des fourches de réplication (pour revue : Magdalou *et al.*, 2014). Or, nos résultats montrent que la déplétion en CDA induit un ralentissement de la vitesse de progression des fourches de réplication alors que la déplétion en PARP-1 induit une accélération de leur vitesse de progression. En revanche, la déplétion de la CDA ou de PARP-1 conduit dans les deux cas à une augmentation de la quantité d'ADN non répliqué à l'origine de la formation d'UFBs surnuméraires en mitose. Nos travaux ont ainsi permis de révéler qu'un déséquilibre du pool de nucléotides pouvait affecter la réplication, indépendamment de sa capacité à interférer avec la vitesse de progression des fourches de réplication (⑤ de la figure 74), et ce, en réduisant l'activité de PARP-1.

Ces résultats ouvrent de nouvelles pistes de réflexion pour la compréhension des origines moléculaires des différentes anomalies caractéristiques des cellules BS. En effet, il est intéressant de se demander dans quelle mesure la réduction de l'activité basale de PARP-1 pourrait contribuer à d'autres aspects du phénotype Bloom tels que l'augmentation de la fréquence des SCEs (⑥ de la figure 74) ou la prédisposition au développement de cancers. Nos résultats illustrent ainsi l'importance de la déficience en CDA dans le phénotype Bloom mais également dans un contexte plus général, puisque la déplétion de cette dernière dans des lignées exprimant BLM induit également une réduction de l'activité de PARP-1 et une augmentation de la fréquence des UFBs. Enfin, d'une manière plus générale, ces observations renforcent notre conviction que la prise en compte de la chute de l'expression de la CDA est indispensable dans les études impliquant la déficience en protéine BLM.

Les UFBs correspondent à des séquences d'ADN non répliquées perdurant en mitose

En absence de la CDA, la réduction de l'activité de PARP-1 conduit à l'accumulation de séquences d'ADN non répliquées, préférentiellement situées au niveau de sites difficiles à répliquer, qui perdurent en mitose et induisent la formation d'UFBs surnuméraires en anaphase.

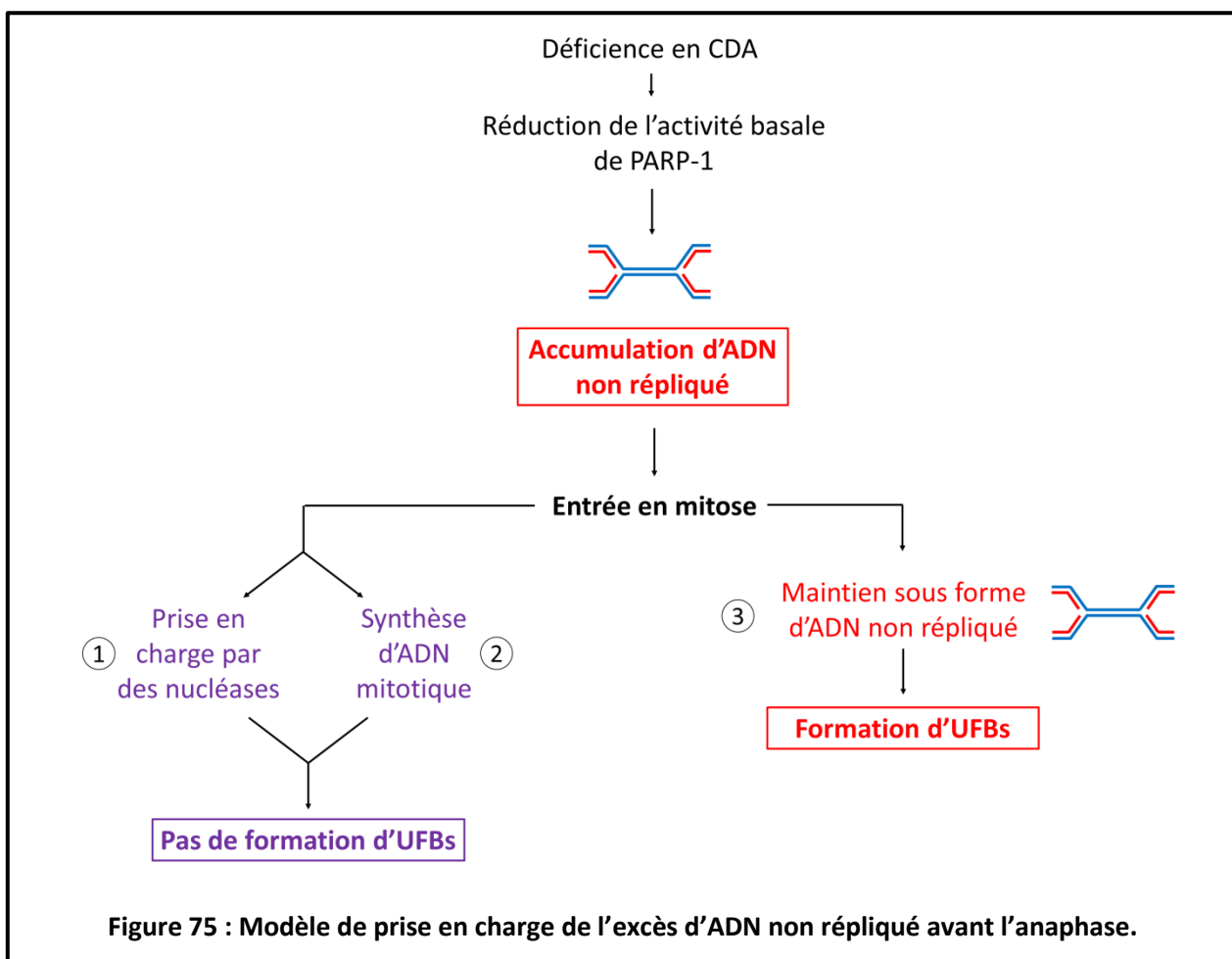
Comme évoqué dans la section « Présentation du projet de recherche » p.161, trois types d'UFBs ont été décrit : les UFBs centromériques (C-UFBs) majoritaires, les UFBs associés à des sites fragiles (FS-UFBs) et les UFBs télomériques (T-UFBs) (Liu *et al.*, 2014). La déficience en CDA conduit à une

augmentation de tous les types d'UFBs, suggérant qu'ils résultent probablement du même mécanisme moléculaire. Ainsi, malgré leurs positions relatives différentes sur le chromosome, les séquences d'ADN à l'origine de la formation des UFBs ont pour point commun d'être des séquences considérées comme présentant des difficultés intrinsèques de réplication et une réplication tardive en fin de phase S voire en G2 (Ma *et al.*, 2012 ; Le Beau *et al.*, 1998 ; Wang *et al.*, 1999 ; Gilson et Géli, 2007 ; Watanabe *et al.*, 2012). Par conséquent, nous avons proposé que tous les UFBs surnuméraires pourraient être la conséquence d'ADN non répliqué perdurant en mitose.

De manière intéressante, nous avons montré que l'incorporation d'EdU dans l'ADN pendant les phases S et G2 ne permet pas de marquer les UFBs, contrairement aux ponts chromatiniens classiques. Ces résultats confirment que les ponts chromatiniens correspondent à des séquences d'ADN complètement répliquées, alors qu'à l'inverse, ils suggèrent que les UFBs correspondent à de l'ADN non répliqué en fin de phase S et perdurant en mitose. Étonnamment, aucun UFB ne présente de marquage EdU ce qui suggère ❶ que les UFBs dérivent probablement tous d'ADN non répliqué (pas seulement les UFBs surnuméraires formés en absence de la CDA), et que ❷ tous les types d'UFBs possèdent vraisemblablement la même origine moléculaire, corroborant notre hypothèse. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que la structure particulièrement fine des UFBs ne permette pas la détection de l'EdU. Nos résultats montrant que la réplication complète des centromères est compromise dans les cellules déficientes en CDA sont néanmoins en faveur de notre hypothèse.

Des sites de synthèse d'ADN sont visualisables en début de mitose par incorporation d'EdU, et leur fréquence est augmentée lorsque la réplication est perturbée, par exemple lors d'un traitement avec de l'APH ou après déplétion de la polymérase η (Naim *et al.*, 2013 ; Bergoglio *et al.*, 2013). Il a été proposé que ces sites de synthèse mitotique pourraient correspondre à des séquences d'ADN non répliquées en fin de phase S et perdurant en mitose. La synthèse d'ADN mitotique refléterait alors leur réplication tardive. De manière intéressante, la déficience en CDA ou la réduction de l'activité de PARP-1 induisent une augmentation de la synthèse d'ADN mitotique corrélée à une augmentation de la fréquence des UFBs. À l'inverse, la réactivation de PARP-1 dans des cellules déficientes en CDA permet de réduire à la fois la synthèse d'ADN mitotique et la fréquence des UFBs. En outre, nous avons montré que ces sites de synthèse localisent à proximité des centromères et des CFS, deux des principaux « points d'ancrage » des UFBs. Il est d'ailleurs intéressant de noter que le pourcentage de co-localisations des sites de synthèse mitotique avec les centromères et les CFS (respectivement $\approx 55\%$ et 24%) coïncide avec le pourcentage de C-UFBs et de FS-UFBs (respectivement environ $\approx 50\%$ et 30%). L'ensemble de ces observations démontre qu'il existe

une corrélation entre la fréquence de foyers de synthèse d'ADN mitotique, la localisation de ces foyers et la formation des UFBs. Ces résultats viennent conforter notre hypothèse selon laquelle la déficience en CDA pourrait compromettre la réplication de séquences préférentiellement situées au niveau des CFS ou des centromères. L'augmentation de la synthèse d'ADN mitotique après déplétion en CDA serait donc le reflet d'une quantité plus élevée de séquences d'ADN non répliquées présentes en mitose. Cette synthèse constituerait donc un mécanisme de secours qui permettrait une réplication/réparation par synthèse de certaines séquences non répliquées avant l'entrée en anaphase, prévenant ainsi la formation d'une partie des UFBs.



Enfin, il a également été montré que certaines nucléases telles que Mus81-Eme1 et ERCC1 prenaient en charge une partie de l'ADN non répliqué perdurant en mitose. Ce mécanisme consisterait en un clivage de la séquence d'ADN non répliquée conduisant ainsi à un ADN double brin intact d'un côté et à une CDB de l'autre (Ying *et al.*, 2013 ; Naim *et al.*, 2013). De manière similaire à la synthèse d'ADN mitotique, ce système permettrait la prise en charge de certaines séquences d'ADN non répliquées avant l'entrée en anaphase permettant ainsi la séparation correcte des

chromatides sœurs. La déplétion de la nucléase Mus81 conduit à l'inhibition de ce mécanisme et à une augmentation de la fréquence des UFBs (Ying *et al.*, 2013), ce qui est cohérent avec notre hypothèse selon laquelle les UFBs résulteraient de séquences d'ADN non répliquées perdurant jusqu'en anaphase.

En résumé, l'action de nucléases telles que Mus81 (① de la figure 75) et la synthèse d'ADN mitotique (② de la figure 75) permettraient de répliquer/réparer une partie des séquences d'ADN non répliquées avant l'entrée en anaphase. Les séquences d'ADN non répliquées n'ayant pas été prises en charge par ces mécanismes conduiraient alors à la formation des UFBs (③ de la figure 75).

Nos résultats indiquent donc que les UFBs correspondent à des séquences d'ADN qui ne sont pas répliquées en fin de phase S et qui perdurent sous cette forme jusqu'en anaphase.

Surveillance de l'ADN non répliqué par les points de contrôle

La diminution de l'activité de PARP-1 et de la synthèse subséquente de PAR se traduisent par une réduction de l'activation de Chk1 et par une efficacité amoindrie des points de contrôle régulés par celle-ci. Cela favorise alors le passage en mitose de séquences d'ADN non répliquées et par conséquent la formation d'UFBs.

La notion de point de contrôle englobe les cascades de signalisation impliquées : ① dans l'arrêt du cycle en réponse à différents stress, permettant ainsi de répondre aux agressions pouvant menacer l'intégrité de la cellule ; mais aussi ② dans la régulation des transitions entre les différentes phases du cycle cellulaire, favorisant ainsi la complétion des mécanismes propres à une phase avant le passage à la suivante (pour revue : Labib et De Piccoli, 2011). La kinase Chk1 joue un rôle central dans ces deux aspects. En effet, l'activité de Chk1 est nécessaire pour l'efficacité des points de contrôle des phases S et G2-M qui permettent de prévenir la progression dans le cycle de cellules présentant des dommages de l'ADN. L'activité de Chk1 est également indispensable pour la régulation du point de contrôle S-M prévenant le passage en mitose avant la réplication complète de l'ADN (pour revues : Smits et Gillespie, 2015 ; Nakanishi *et al.*, 2010 ; Patil *et al.*, 2013).

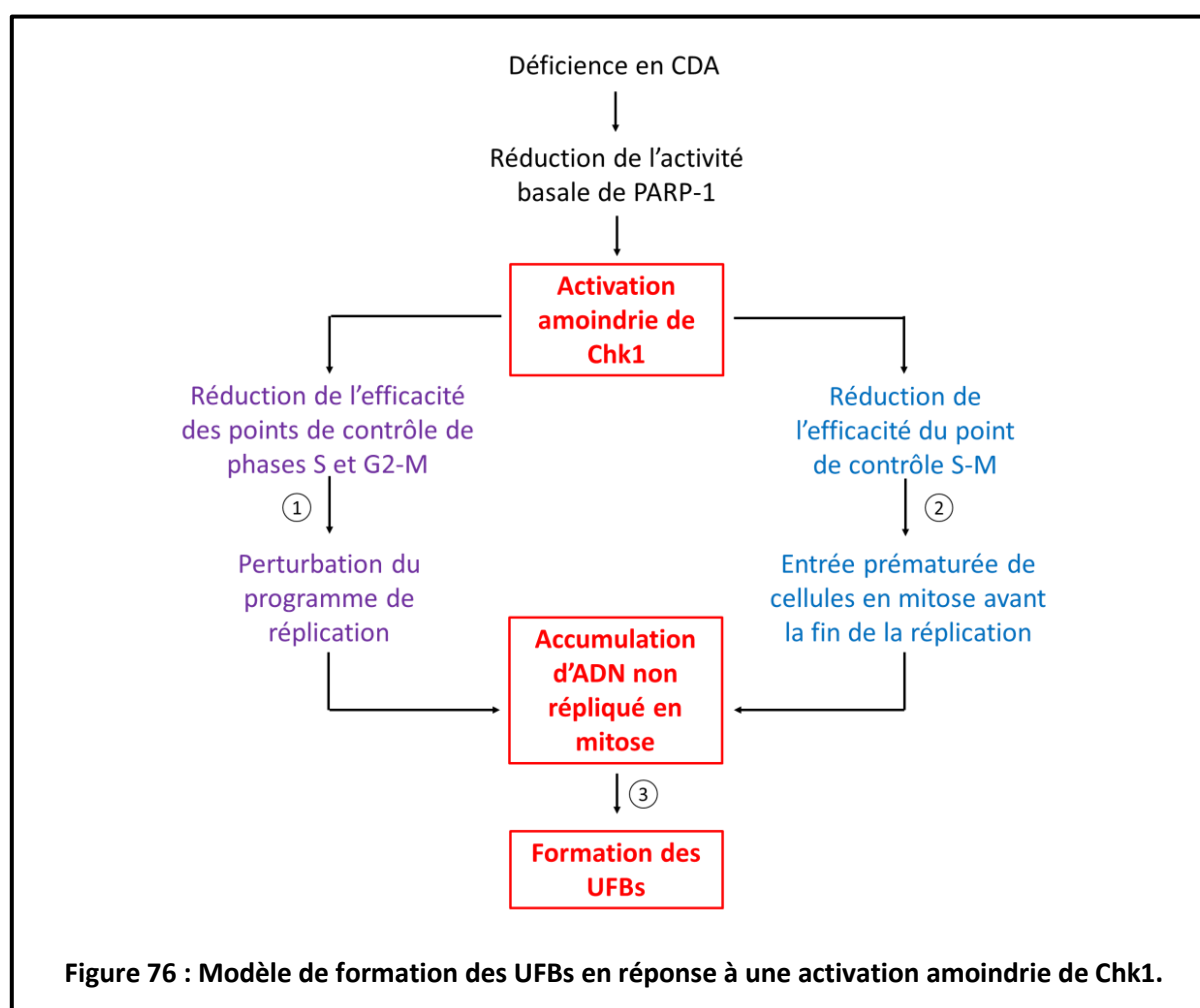
Nos données suggèrent un lien direct entre l'efficacité des points de contrôle régulés par Chk1 et l'accumulation d'ADN non répliqué en mitose à l'origine de la formation subséquente d'UFBs. Sur la base de ces résultats nous avons proposé deux modèles non exclusifs qui pourraient expliquer

comment la réduction de l'efficacité des points de contrôle dépendants de Chk1 induit la présence d'ADN non répliqué en mitose.

① Le rôle des points de contrôle des phases S et G2-M dans la surveillance des séquences d'ADN non répliquées reste flou. En effet, la présence de telles séquences ne constitue pas, en soi, un signal activateur de ces points de contrôle. Néanmoins, il devient clair que ces mécanismes de réponse à des dommages de l'ADN participent à la réplication et ceci, même en absence de stress exogènes. Il est en effet actuellement proposé que ces points de contrôle pourraient être activés à l'état basal par les lésions de l'ADN endogènes et les intermédiaires d'ADNsb présents à la fourche de réplication. Ils participeraient alors : (1) à la régulation de certaines étapes du programme de réplication comme l'initiation, la stabilisation des complexes de réplication et la cohésion des chromatides ; (2) à la promotion du redémarrage des fourches de réplication et à l'activation des origines de réplifications dormantes ; et enfin, (3) au soutien de la machinerie de réplication au niveau des sites difficiles à répliquer (pour revue : Jones et Petermann, 2012). Il est alors possible d'imaginer qu'en absence de la CDA, la diminution de l'activation de Chk1 et des points de contrôle des phases S et G2-M pourraient perturber le programme de réplication, favorisant ainsi l'accumulation de séquences d'ADN qui n'ont pas été complètement répliquées en fin de phase S et qui perdurent en mitose (① de la figure 76). Selon ce modèle, le fait que les CFS, centromères et télomères présentent une sensibilité accrue aux perturbations du programme de réplication, favoriserait leur réplication incomplète avant la fin de la phase S, induisant la formation des UFBs et expliquant probablement pourquoi ces derniers dérivent majoritairement de ces séquences. Enfin, cette hypothèse est soutenue par la présence de CSBs à l'état basal dans les cellules déficientes en CDA (Gemble *et al.*, 2015 ; Résultats : partie 1), qui confirme que l'efficacité des points de contrôle chargés de la surveillance des dommages de l'ADN est effectivement affaiblie, et ce, même en absence de stress exogènes.

② Le point de contrôle S-M, lui aussi régulé par Chk1, pourrait également expliquer l'accumulation de séquences d'ADN non répliquées en mitose. Celui-ci reste actif tant que la réplication n'est pas terminée afin de prévenir l'entrée prématurée des cellules de phase S en mitose (pour revue : Petermann et Caldecott, 2006). Or, la déplétion de Chk1 est associée à des dérégulations de cette transition S-M. Ainsi, dans des cellules embryonnaires murines, la déplétion de Chk1 conduit à l'activation prématurée des couples Cycline A/Cdk2 et Cycline B/Cdk1, respectivement impliqués dans les étapes précoces de la phase S et lors de l'entrée en mitose (Katsuno *et al.*, 2009 ; Niida *et al.*, 2005 ; Nakanishi *et al.*, 2010). L'activation inadaptée du couple Cycline A/Cdk2 a été associée à une dérégulation du programme de réplication alors que l'activation

du couple Cycline B/Cdk1 provoque l'entrée prématurée des cellules en mitose (Niida *et al.*, 2005). Dans des lignées humaines, la déplétion de Chk1 induit l'activation inappropriée de la kinase Aurora B ce qui conduit à l'entrée de cellules de la phase S directement en mitose, alors que la réplication de l'ADN n'est pas terminée (Zuazua-Villar *et al.*, 2014). Sur la base de ces observations, il est alors possible d'imaginer que la déplétion en CDA et la diminution subséquente de l'activation de Chk1 pourraient également favoriser l'entrée prématurée de cellules de la phase S en mitose, et ceci avant la complétion de la réplication. Ce mécanisme pourrait ainsi expliquer l'accumulation d'ADN non répliqué en mitose à l'origine de la formation des UFBs (② de la figure 76). Selon ce modèle, la réplication tardive des CFS, centromères et télomères favoriserait alors le fait qu'ils soient incomplètement répliqués lors du passage prématuré de cellules de phase S en mitose, expliquant probablement pourquoi les UFBs dérivent majoritairement de ces séquences. Enfin, cette hypothèse est soutenue par le fait que l'inhibition d'ATR, la kinase activant Chk1, réduit l'efficacité du point de contrôle S-M ce qui conduit à une augmentation du nombre d'UFBs (Eykelboom *et al.*, 2013).



Lorsque l'activité de Chk1 est diminuée, la présence d'ADN non répliqué en mitose pourrait donc être la conséquence : ❶ de la réduction de l'efficacité des points de contrôle de dommages de l'ADN perturbant le programme de réplication et/ou ❷ de la dérégulation des protéines impliquées dans les transitions entre la phase S et la mitose favorisant le passage en mitose de cellules n'ayant pas terminé de répliquer leur génome ; ces deux hypothèses n'étant pas exclusives. Ces résultats démontrent ainsi que l'activation optimale des cascades de signalisation en aval de Chk1 est indispensable pour prévenir l'accumulation de séquences d'ADN non répliquées en mitose et la formation d'UFBs (❸ de la figure 76).

L'analyse de la fréquence des UFBs dans des cellules exprimant la CDA en présence ou non d'inhibiteurs de certains acteurs spécifiques de chaque point de contrôle régulé par Chk1, devrait permettre d'identifier la ou les voies de signalisation nécessaires à la prévention de l'accumulation d'ADN non répliqué en mitose. En outre, le rallongement de la phase G2, grâce à l'inhibition de cdk1 ou de Plk1, devrait permettre de terminer la réplication avant l'entrée en mitose, prévenant ainsi la formation d'UFBs en anaphase.

Conséquences de la présence de séquences d'ADN non répliquées en mitose

La déplétion de la CDA conduit à l'accumulation de séquences d'ADN non répliquées en mitose associée à une augmentation du pourcentage de cellules prométaphasiques présentant des disjonctions partielles des chromatides sœurs.

Nous avons montré que la disjonction partielle des chromatides sœurs en absence de la cohésine résultait, tout comme la formation des UFBs, de l'accumulation d'ADN non répliqué en mitose. Il est cependant surprenant de noter que cette disjonction incomplète des chromatides sœurs affecte l'ensemble des chromosomes d'une cellule et pas seulement quelques chromosomes isolés. En effet, pour une prométaphase donnée on observe que la quasi-totalité des chromatides présente soit une disjonction totale soit une disjonction partielle. Cette observation implique que le mécanisme à l'origine de la disjonction partielle des chromatides est un phénomène global qui affecte la totalité des chromosomes d'une cellule, ce qui évoque un système de point de contrôle. Ainsi, l'activation de ce dernier serait dépendante de la quantité d'ADN non répliqué en mitose et serait à l'origine du maintien de la cohésion des chromatides sœurs en absence de cohésine. Sur la base de ces

observations, nous proposons un modèle hypothétique comprenant trois étapes impliquées dans la détection et la prise en charge de l'ADN non répliqué en mitose.

① La première étape de ce modèle consisterait en l'activation d'un mécanisme empêchant la séparation des chromatides sœurs en absence de la cohésine, inhibant ainsi l'entrée en anaphase. Celui-ci prendrait donc place en prométaphase et son activation serait corrélée à la quantité d'ADN non répliqué en mitose. Il permettrait alors à la cellule de retarder l'entrée en anaphase le temps de prendre en charge au moins une partie des séquences d'ADN non répliquées présentes en mitose, limitant ainsi la formation des UFBs.

② L'inhibition de la séparation des chromatides sœurs pourrait ensuite permettre de prendre en charge une partie des séquences d'ADN non répliquées présentes en mitose, vraisemblablement via la synthèse d'ADN mitotique et l'action de certaines nucléases telles que Mus81.

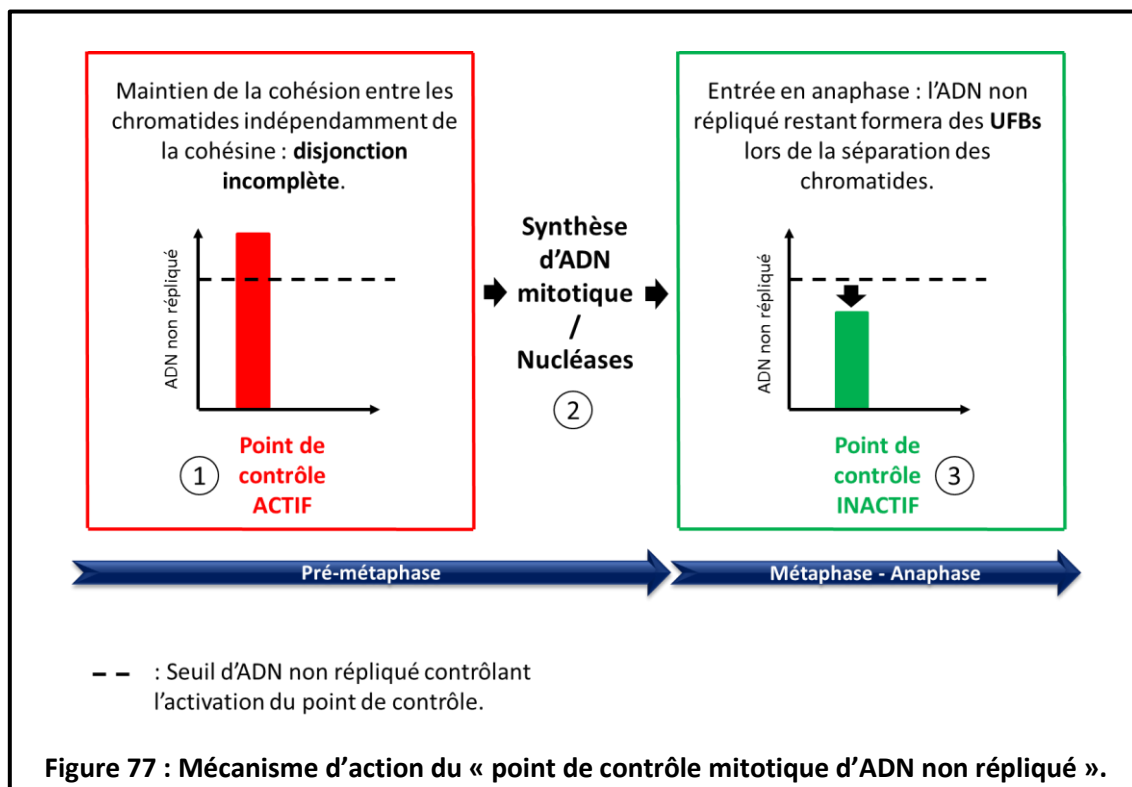
③ Enfin, une fois la quantité d'ADN non répliqué réduite au-dessous d'un certain seuil, le mécanisme empêchant la séparation des chromatides sœurs serait levé, permettant l'entrée en anaphase. L'excès d'ADN non répliqué qui n'a pas été pris en charge par ce système sera à l'origine de la formation des UFBs.

Cette hypothèse suggère donc qu'il existe un seuil d'ADN non répliqué au-delà duquel ce point de contrôle serait actif et en deçà duquel celui-ci serait levé. Cela suppose également l'existence d'une quantité d'ADN non répliqué au-delà de laquelle le nombre d'UFBs resterait constant. En effet, du fait de l'activation de ce point de contrôle, une cellule n'entrera en anaphase qu'une fois la quantité d'ADN non répliqué réduite au-dessous de ce seuil (vraisemblablement via l'étape de synthèse d'ADN mitotique et l'action de certaines nucléases). Ce seuil d'ADN non répliqué conditionnerait donc la fréquence des UFBs en anaphase créant par conséquent un seuil pour la fréquence de ces derniers. Ainsi, ce point de contrôle permettrait d'expliquer pourquoi la fréquence des UFBs est similaire entre la déplétion totale de PARP-1 et la diminution de son activité basale d'environ 30%. Le nombre d'UFBs similaire entre ces deux conditions correspondant probablement au seuil d'UFBs maximal conditionné par l'activation du point de contrôle.

En résumé, le modèle que nous proposons est le suivant. Il existerait au niveau cellulaire un « point de contrôle mitotique d'ADN non répliqué » ou « mitotic unreplicated DNA checkpoint » chargé de surveiller la quantité d'ADN non répliqué perdurant en mitose. Le dépassement d'un seuil d'ADN non répliqué induirait le maintien de la cohésion des chromatides sœurs, indépendamment de la cohésine, prévenant ainsi l'entrée en anaphase et expliquant les disjonctions incomplètes (① de la figure 77). Ce point de contrôle permettrait ensuite de prendre en charge une partie des

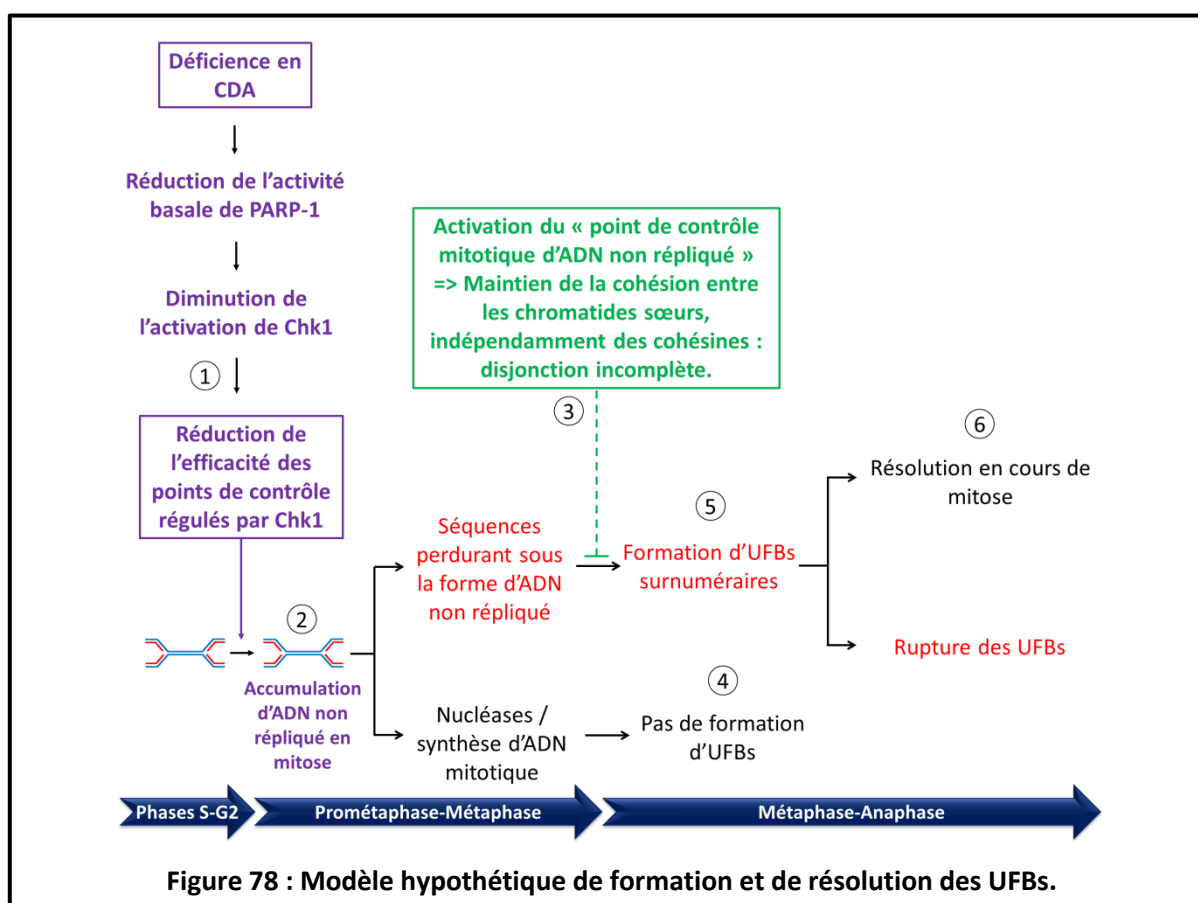
séquences d'ADN non répliquées, notamment grâce à l'activité de certaines nucléases et à la synthèse d'ADN mitotique (② de la figure 77). Enfin, lorsque la quantité d'ADN non répliqué est réduite au-dessous du seuil évoqué précédemment, l'entrée en anaphase est possible ; les séquences d'ADN qui n'ont pas été prises en charge par ce mécanisme formeront alors des UFBs (③ de la figure 77).

Ce point de contrôle permettrait donc de limiter la quantité d'ADN non répliqué perdurant en mitose avant la séparation du matériel génétique, limitant ainsi la fréquence des UFBs.



Sur la base de l'ensemble des résultats obtenus au cours de ma thèse, nous proposons le modèle suivant :

① La déficience en CDA induit une réduction de l'activité basale de PARP-1 compromettant l'activation de Chk1 et l'efficacité des points de contrôle régulés par cette dernière. ② Cela conduit à l'accumulation de séquences d'ADN non répliquées perdurant en mitose. ③ Cet ADN non répliqué va conduire à l'activation du « point de contrôle mitotique d'ADN non répliqué » permettant le maintien de la cohésion des chromatides sœurs, indépendamment de la voie des cohésines, ce qui inhibe le passage en anaphase. ④ L'activation de ce point de contrôle permet la prise en charge d'une partie de l'ADN non répliqué probablement grâce à l'action de nucléases et à la synthèse d'ADN mitotique. ⑤ Lorsque la quantité d'ADN non répliqué diminue au-dessous d'un certain seuil, le point de contrôle est levé et les séquences non répliquées persistantes conduisent à la formation d'UFBs en anaphase. ⑥ Ensuite, la plupart de ces UFBs sont résolus au cours de la mitose selon un mécanisme qui demeure peu compris (Figure 78).



Ce modèle reste bien sur hypothétique et nécessite des investigations supplémentaires pour pouvoir être confirmé, mais il a le mérite de pouvoir expliquer en grande partie l'ensemble des résultats obtenus au cours de ma thèse et de concilier ces derniers avec les données de la littérature.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Les résultats obtenus au cours de ma thèse ont permis d'identifier une nouvelle source d'instabilité génétique affectant à la fois la réplication complète du matériel génétique et l'intégrité de sa transmission au cours de la mitose. En outre, mes données ont une implication directe dans une pathologie humaine puisqu'elles ont permis de mieux comprendre certains aspects du phénotype associé au syndrome de Bloom.

Avant de conclure cette thèse, j'aimerais revenir sur l'hypothèse « *SOS-like* » proposée en 2006 par Mounira Amor-Guérét qui a établi un parallèle entre le SOS bactérien et le phénotype des cellules BS, proposant que ces dernières pourraient présenter une réponse « *SOS-like* » activée constitutivement (Amor-Guérét, 2006 ; cf. *Chapitre 1, p.62*). J'ai toujours considéré cette hypothèse comme particulièrement intéressante et attrayante, cette dernière a d'ailleurs en partie motivé ma venue dans cette équipe de recherche. C'est pourquoi je souhaiterais en discuter ici, en m'appuyant sur les données actuelles de la littérature et sur les résultats obtenus lors de ma thèse.

La réponse SOS est un processus décrit chez *E. Coli* permettant de stimuler la réparation de l'ADN lorsque celui-ci subit des dommages très délétères ou lorsque la progression de la fourche de réplication est bloquée (Radman, 1975 ; pour revue : Baharoglu et Mazel, 2014). La recombinaise bactérienne RecA (homologue bactérien de RAD51) est responsable de l'activation de la réponse SOS suite à des dommages de l'ADN. Son recrutement sur l'ADNsb conduit à son activation et au clivage du répresseur LexA qui résulte en une augmentation de la transcription de plusieurs gènes regroupés sous le terme « *SOS regulon* » et impliqués dans la réparation et la réplication (Baharoglu et Mazel, 2014). La mutation E38K de RecA (souche *recA730*) conduit à une réponse SOS constitutive indépendante de la présence de cassures de l'ADN (Ennis *et al.*, 1995 ; Witkin *et al.*, 1982 ; Fijalkowska *et al.*, 1997). De manière intéressante, il a été montré récemment que la déplétion dans cette souche des protéines *ndk* et *dcd*, codant respectivement pour la diphosphate kinase et la dCTP désaminase, a pour conséquence de diminuer l'expression de la totalité des gènes du « *SOS regulon* » (Maslowska *et al.*, 2015). Etant donné que la perte d'expression de ces protéines conduit à une altération du pool de nucléotides se traduisant notamment par une augmentation de la quantité de dCTP intracellulaire (Schaaper et Mathews, 2013 ; Lu *et al.*, 1995 ; Miller *et al.*, 2002 ; Wang et Weiss, 1992 ; Maslowska *et al.*, 2015), les auteurs ont proposé que l'accumulation de dCTP pourrait entraver l'interaction de RecA avec l'ADN en se fixant sur cette dernière à la place de l'ATP, inhibant ainsi l'induction de la réponse SOS (Maslowska *et al.*, 2015).

L'analyse transcriptomique de cellules BS complémentées ou non avec une protéine BLM fonctionnelle n'a pas permis de mettre en évidence une réponse « *SOS-like* » dans ces cellules (Chabosseau *et al.*, 2011). Néanmoins, les cellules BS présentent une augmentation de la quantité intracellulaire de dCTP (Chabosseau *et al.*, 2011), reproduisant le phénotype associé à la déplétion en *ndk* ou en *dcd* évoqué précédemment (Maslowska *et al.*, 2015). Il est alors possible d'imaginer que, de manière similaire aux observations faites chez *E. Coli*, la réponse « *SOS-like* » de ces cellules pourrait être inhibée par l'accumulation de la dCTP, expliquant par conséquent l'absence d'une signature transcriptomique similaire à la réponse SOS bactérienne dans ces cellules.

Sur la base des similarités existant entre l'hypothèse d'une interaction de la dCTP avec RecA, inhibant la réponse SOS (Maslowska *et al.*, 2015), et l'inhibition de PARP-1 par la dCTP (Gemble *et al.*, 2015 ; Résultats : partie 1), il est possible d'imaginer que l'inhibition partielle de PARP-1 par la dCTP pourrait expliquer l'absence de réponse « *SOS-like* » dans les cellules BS. En accord avec cette hypothèse, les cellules tumorales d'ostéosarcomes U2OS déplétées en BLM présentent une hyper-activation de PARP-1 (Gottipati *et al.*, 2010). Or, ces cellules sont les seules, parmi toutes les lignées que nous avons testé, à ne pas présenter de diminution de l'expression de la CDA lorsque BLM est déplétée (Pauline Chabosseau, données non publiées). Ce résultat suggère donc que la perte d'expression de la CDA et l'accumulation subséquente de dCTP dans les cellules BS pourraient masquer une hyper-activation de PARP-1 et une réponse « *SOS-like* » dépendante de celle-ci.

Etant donné que PARP-1 et RecA possèdent des similarités fonctionnelles telles que leur recrutement à l'ADN lors de dommages, ce qui induit une réponse cellulaire favorisant notamment la réparation, et sur la base des observations précédentes, nous proposons que **l'activation de PARP-1 pourrait être l'équivalent fonctionnel chez les mammifères de l'activation de RecA chez les bactéries**. Ainsi, lors de dommages de l'ADN, le recrutement de PARP-1 à l'ADN et son activation subséquente seraient à l'origine de l'induction d'une réponse cellulaire similaire au SOS bactérien permettant aux cellules de mammifères de s'adapter à un stress en réparant ou transformant leur génome. Différentes approches expérimentales sont en cours au laboratoire pour caractériser une éventuelle signature propre à une réponse « *SOS-like* » chez les mammifères et pour déterminer le rôle éventuel de PARP-1 dans cette réponse.

La réponse SOS bactérienne est un mécanisme favorisant la survie au détriment de la stabilité du génome. Si une telle réponse existe chez les mammifères, elle pourrait être une importante source d'instabilité génétique promouvant la cancérogenèse. La mise en évidence d'une telle signature aurait donc des implications en cancérologie permettant de mieux comprendre les

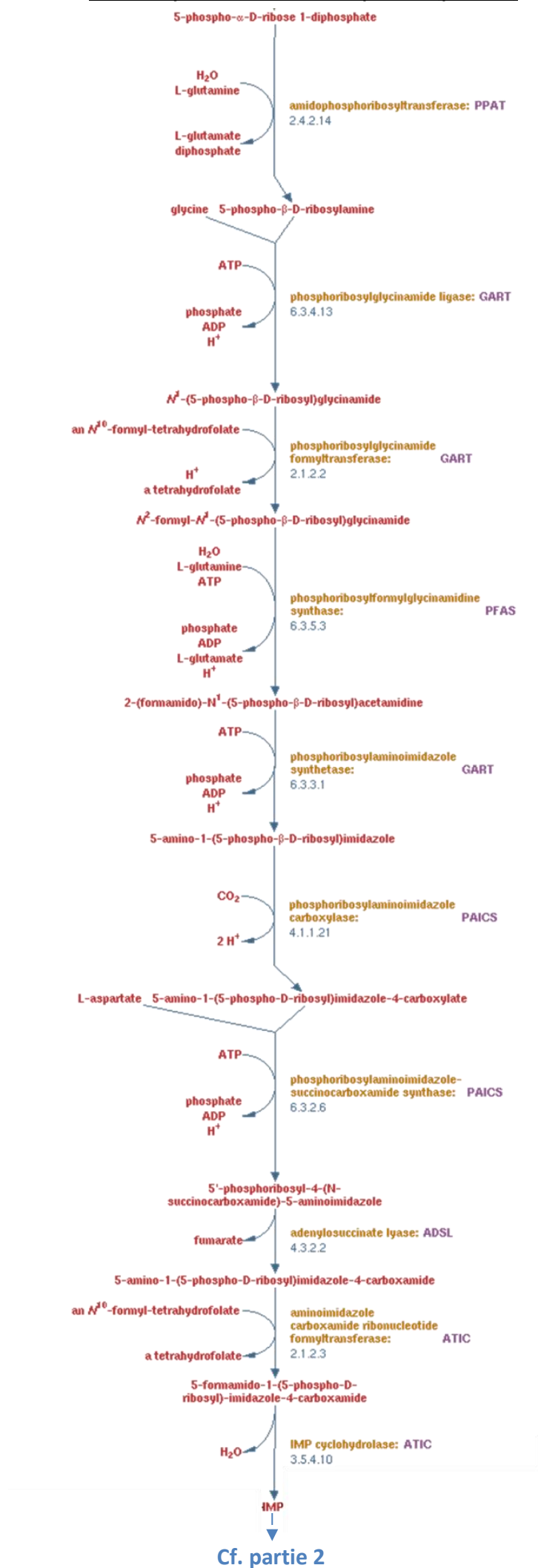
premières étapes du développement de cancers voire même de détecter précocement des lésions pré-tumorales.

ANNEXES

Voies de biosynthèse des nucléotides

D'après « HumanCyc database »

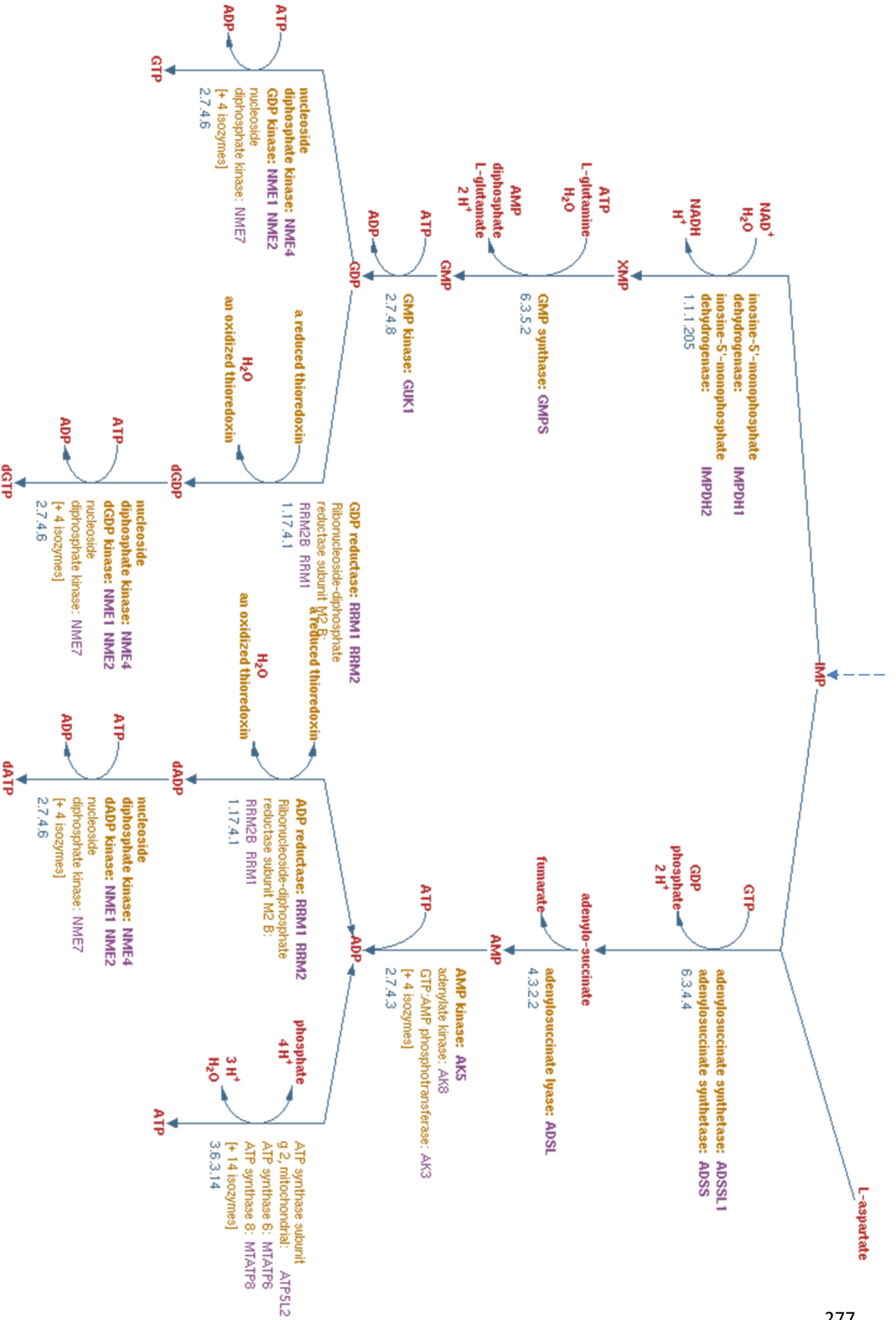
Voie de synthèse de novo des purines (partie 1)



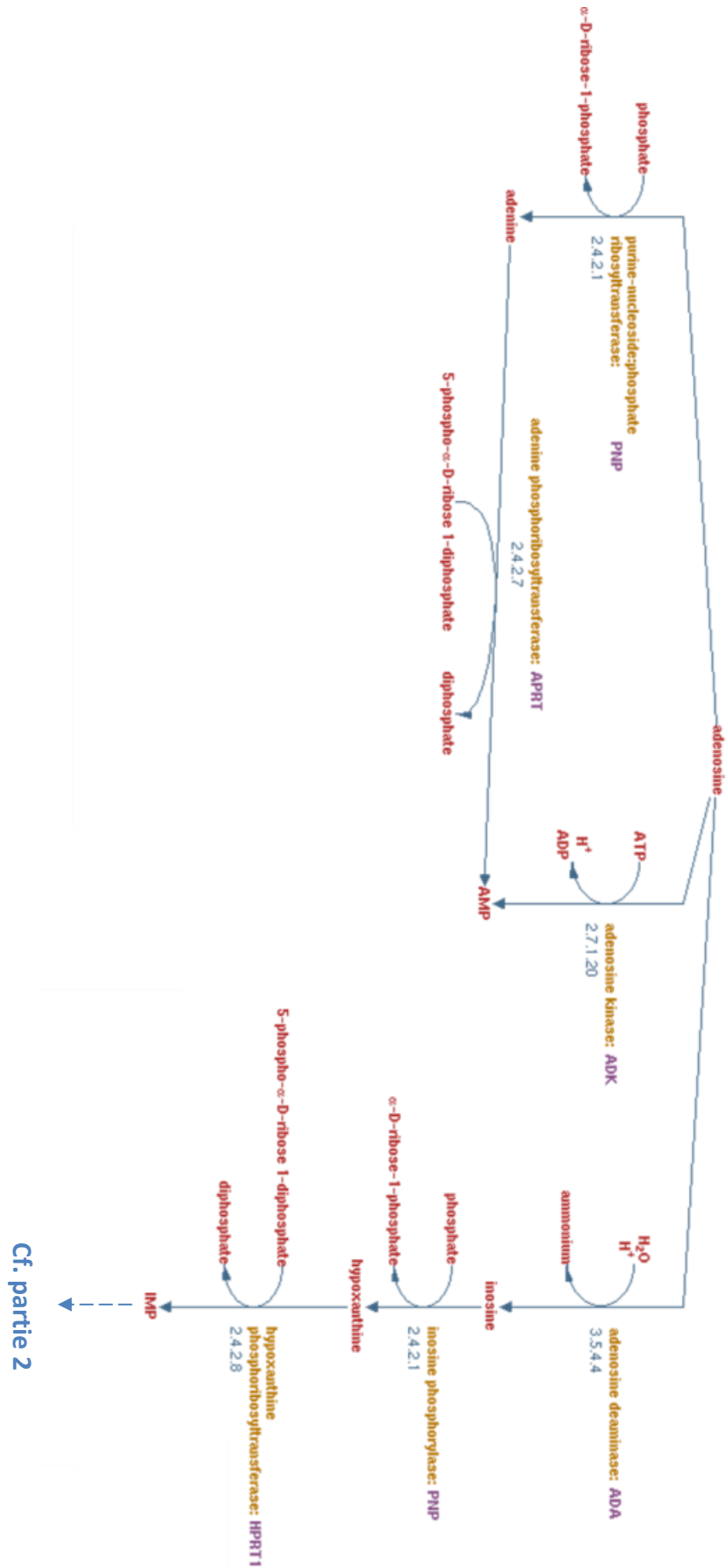
Cf. partie 2

Voie de synthèse de novo des purines (partie 2)

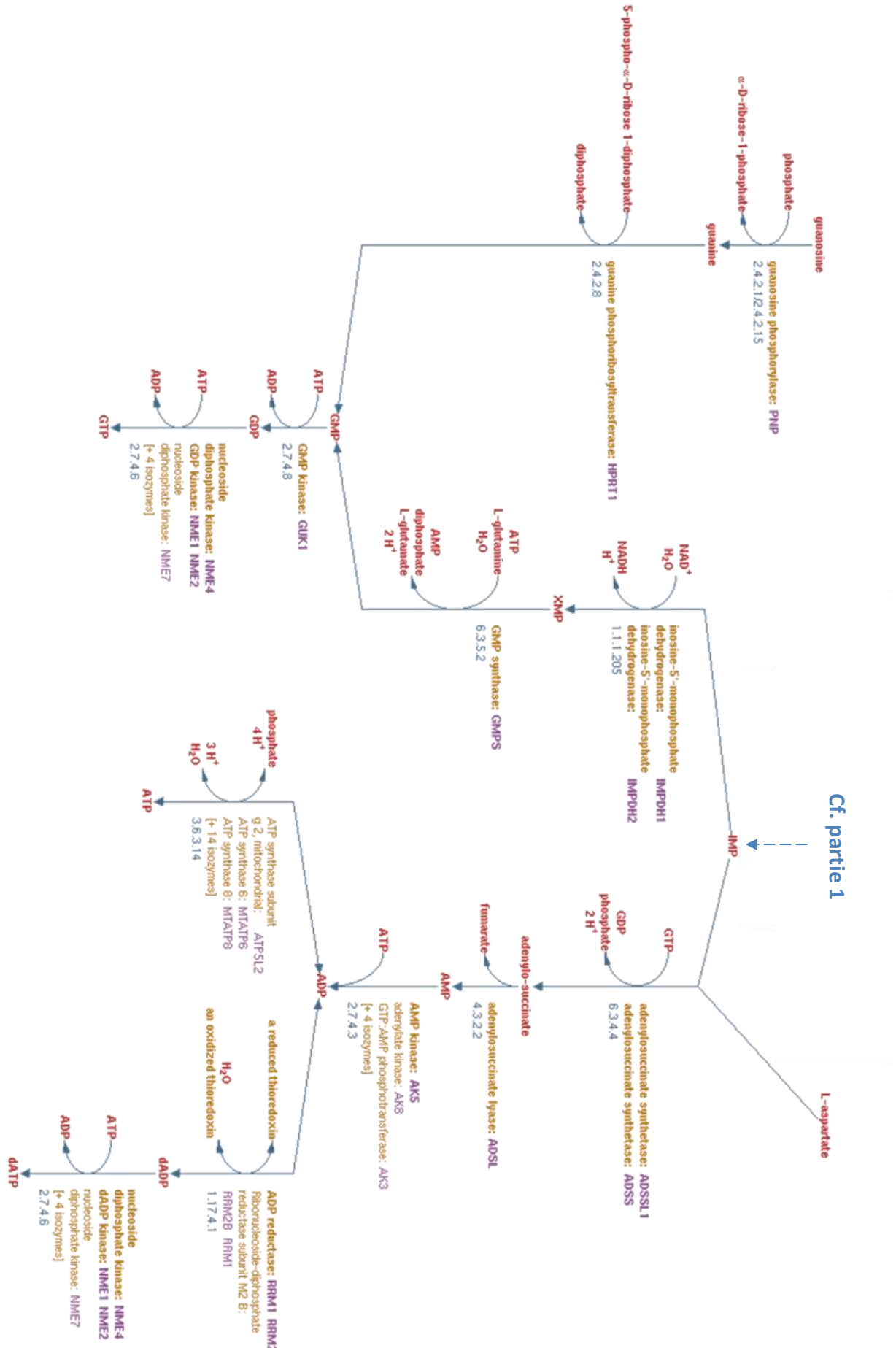
Cf. partie 1



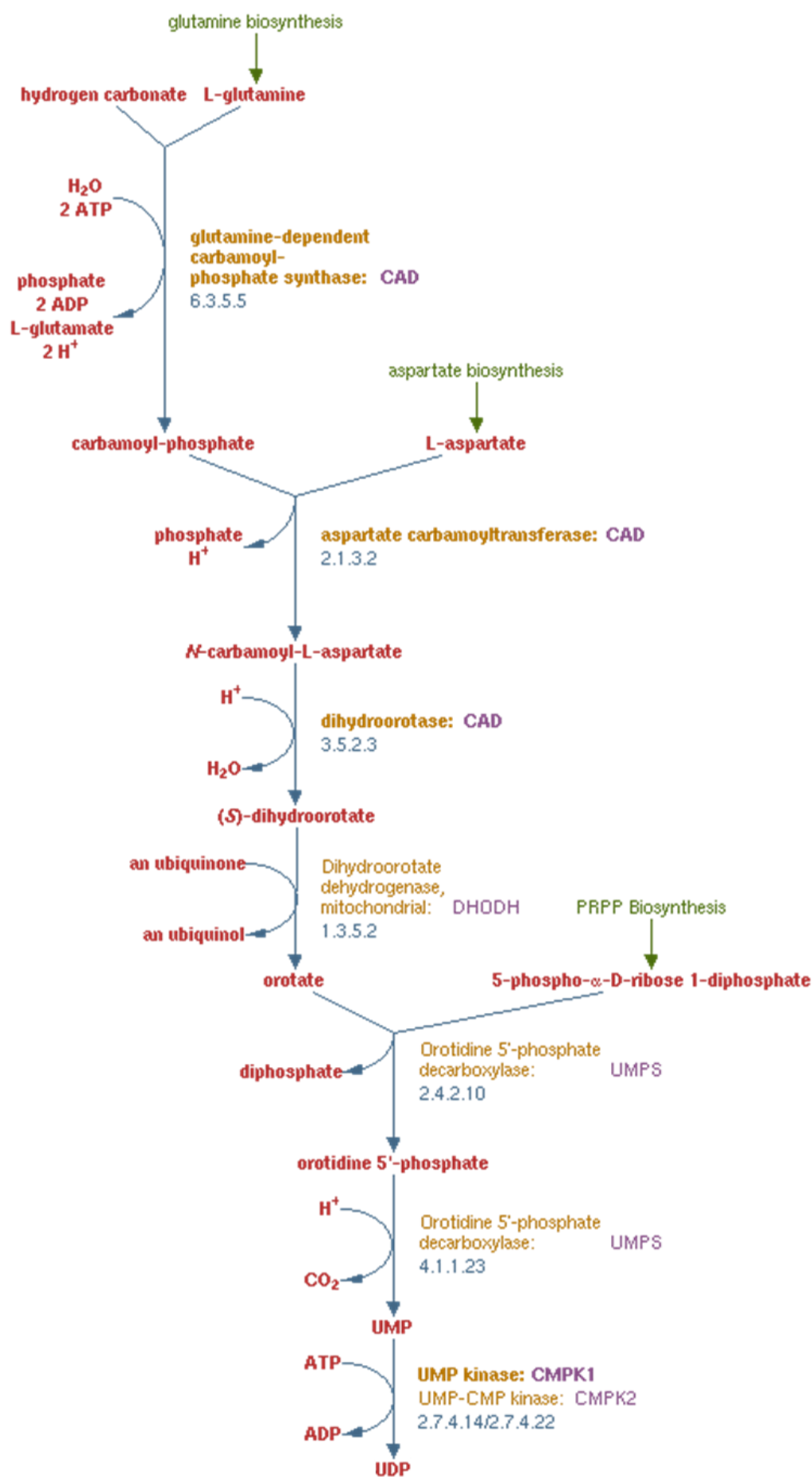
Voie de synthèse de sauvetage des purines (partie 1)



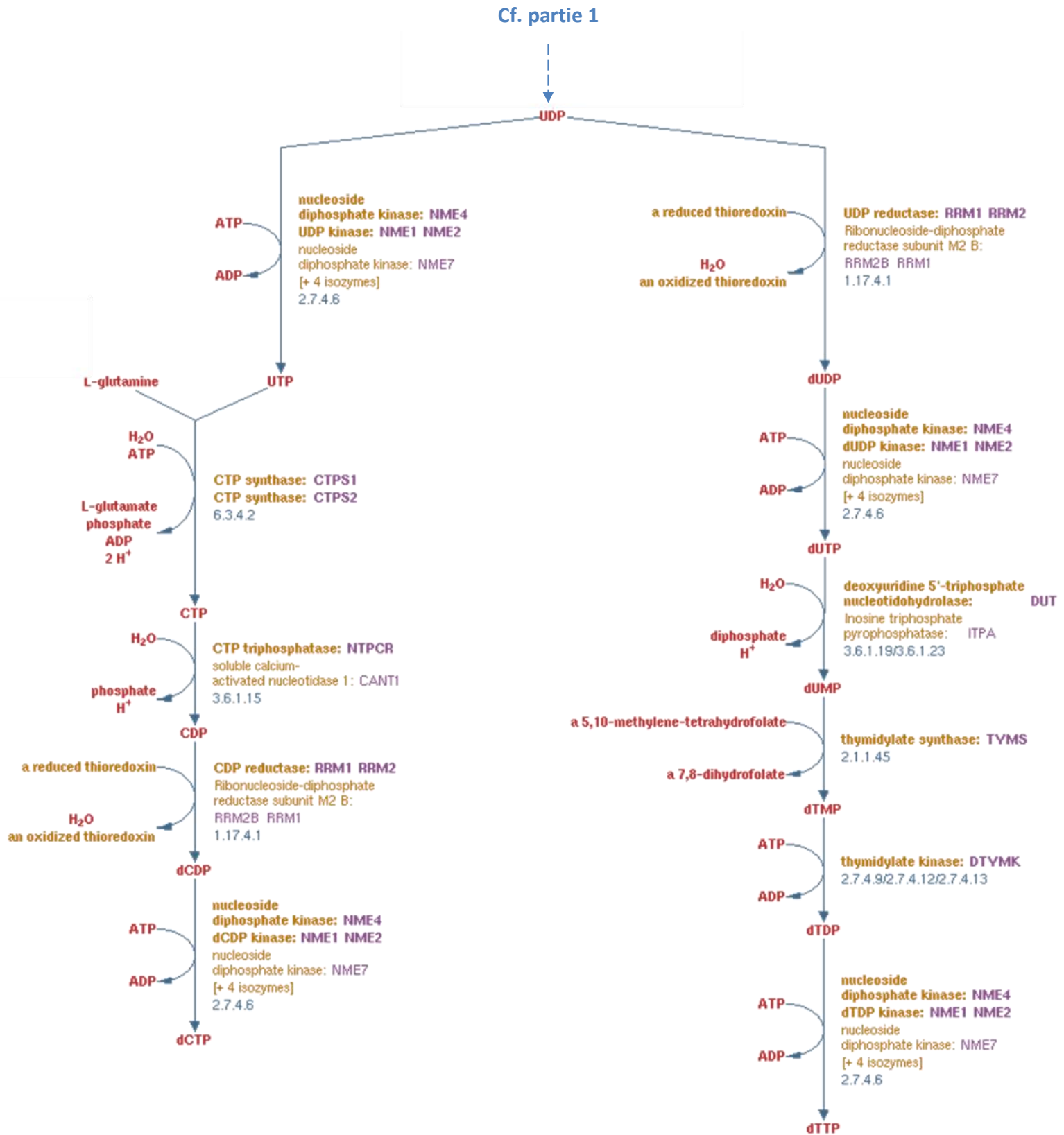
Voie de synthèse de sauvetage des purines (partie 2)



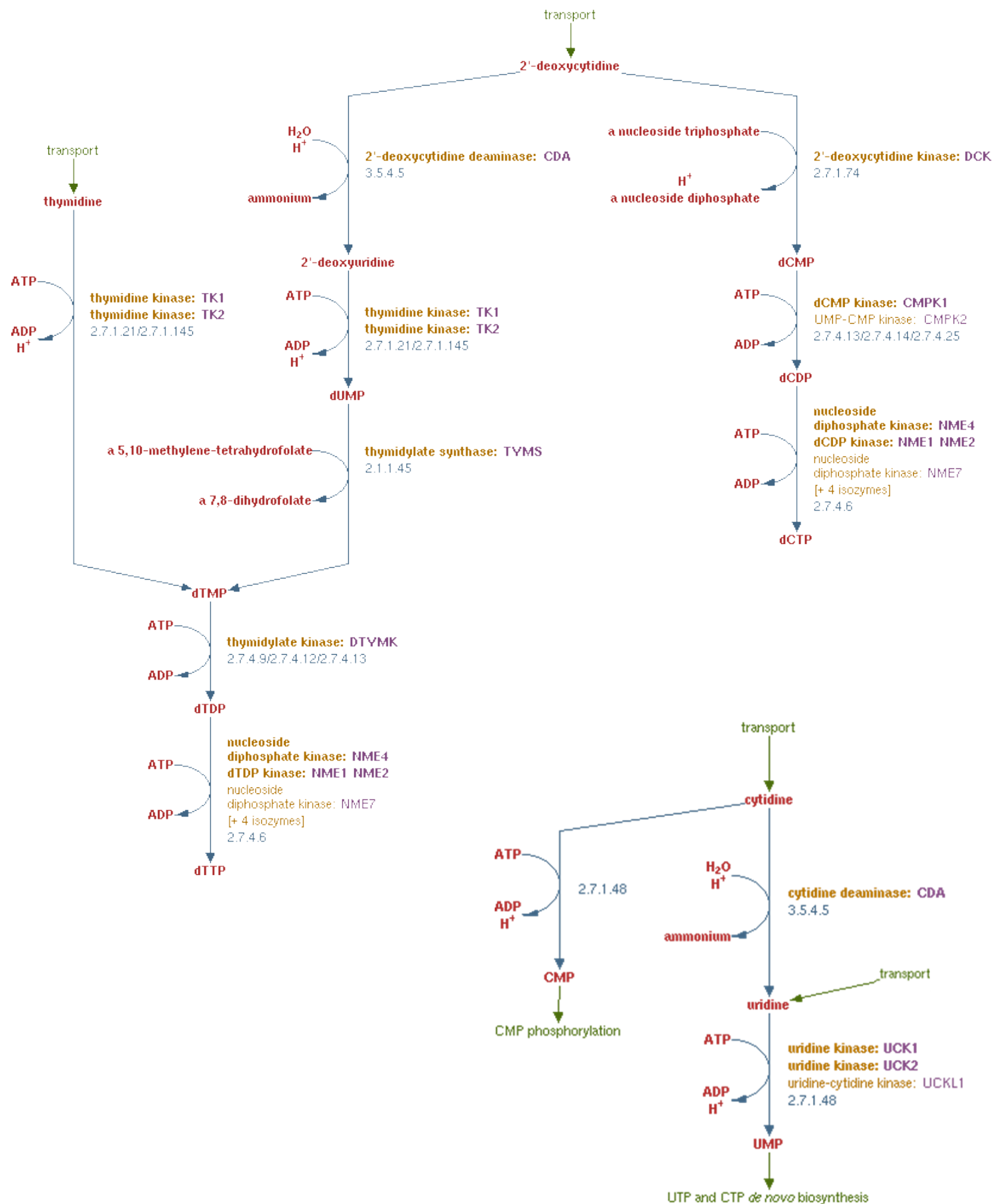
Voie de synthèse de novo des pyrimidines (partie 1)



Voie de synthèse de novo des pyrimidines (partie 2)



Voie de synthèse de sauvetage des pyrimidines



Pathologies associées à des désordres métaboliques des purines ou pyrimidines

D'après Jurecka, 2009

Table 2 Inborn errors of purine metabolism

Defect (synonym)	Clinical manifestation	Diagnostic metabolites	Treatment
Adenosine deaminase deficiency (ADA deficiency)	Early onset: severe combined immunodeficiency (SCID)—profound lymphopenia (T- and B-cells), recurrent opportunistic infections, failure to thrive in infancy Delayed/late onset: combined immune deficiency (diagnosis 1–10 years of age/after the first decade) Congenital aplastic anaemia with anisopoikilocytosis and stomatocytosis (Diamond–Blackfan syndrome) Type I: intractable seizures, profound psychomotor retardation, autistic features Type II: mild/moderate psychomotor retardation, contact disturbances Neonatal form: encephalopathy with hypotonia, seizures, prenatal manifestations Dysmorphism, neurological deficit, congenital blindness	dAdo↑, dATP↑ (RBC)	BMT, ERT with PEG-ADA
Adenosine deaminase superactivity (ADA superactivity)		None	Not established
Adenylosuccinate lyase deficiency (adenylosuccinase deficiency)		S-Ado↑, SAICAr↑	Not established
AICAR transformylase and IMP cyclohydrolase deficiency (ATIC)		AICAr↑, SAICAr↑, S-Ado↑	Not established
Adenylylate kinase deficiency	Haemolytic anaemia	None	Supportive care
Adenylylate deaminase deficiency (AMP deaminase deficiency): Muscle: AMPD-1 (MAD) Erythrocytes: AMPD-3	Exercise-related muscular weakness, muscle cramps and myalgia	NH ₃ ↓ (exercise test)	Ribose and xylitol
Aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase deficiency (xanthinuria II)	UTI, nephrolithiasis, acute renal failure	(hypo-)xan↑, UA↓	Allopurinol, high fluid intake, low-purine diet
Adenine phosphoribosyltransferase deficiency (2,8-di-OH-adeninuria)	2,8-dhAde renal lithiasis, crystalluria, acute renal failure, UTI	2,8-dhAde↑, Ade↑	Allopurinol, high fluid intake, low-purine diet, avoidance of dietary alkalis
Deoxyguanosine kinase deficiency	Mitochondrial depletion syndrome—hepatocerebral form	mtDNA depletion	Not established
Familial juvenile hyperuricaemic nephropathy (juvenile gout)	Juvenile gout, hypertension, rapid progressive renal insufficiency, renal stones, renal failure	UA↑	Allopurinol, high fluid intake, low-purine diet

Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency:	• Choreoathetosis, spastic quadriplegia, mental/growth retardation, urolithiasis, acute renal failure, self-mutilation (only LND)	UA↑, hyp↑	Allopurinol, high fluid intake, low-purine diet
• Lesch-Nyhan disease (LND)	• Gouty arthritis, crystalluria, urolithiasis, mild or no neurological symptoms		
• HPRT-related hyperuricaemia (HRH)			
• HPRT-related hyperuricaemia with neurologic deficit without behavioural changes (HRND)			
Inosine monophosphate dehydrogenase type I deficiency (IMPDH I)	Retinitis pigmentosa	IMP↑/GMP↓	None
Inosine monophosphate dehydrogenase type II superactivity (IMPDHs II)	Activation in malignancies		
Inosine triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency (ery-ITPA deficiency)	Possible thiopurine drug toxicity	ITP↑ (RBC)	None
Methylthioadenosine phosphorylase deficiency (cancer cells MTAP deficiency)	Activation in malignancies	MTAdo↑ (cancer cells)	None
Molybdenum cofactor deficiency (combined deficiency of AO, XDH and SO, xanthinuria-III, xanthinuria-sulfituria)	Neonatal: intractable seizures, ocular lens dislocation, severe neurological abnormalities, sometimes microcephaly	(hypo-)xan↑, sulfite↑, thiosulfate↑, S-sulfocystine↑, cysteine↓, UA↓	Not established
Purine nucleoside phosphorylase deficiency (PNP deficiency)	Late presentation: mild symptoms	(d)Ino↑, (d)Guo↑, dGTP↑ (RBC), UA↓	BMT
Phosphoribosylpyrophosphate synthase superactivity (PRPS superactivity)	Immunodeficiency (lymphocytes T), recurrent infections esp. viral, neurological abnormalities (mental/motor retardation, ataxia, hyper/hypotonia)	UA↑	Allopurinol, high fluid intake, low-purine diet, alkalization of urine
S-Adenosylhomocysteine hydrolase deficiency (SAHH deficiency)	Early onset: severe neurodevelopmental impairment, dysmorphic features, sensorineural deafness	SAH↑ (RBC)	As in ADA, PNP and HPRT
Thiopurine methyltransferase deficiency (TPMT deficiency)	Late juvenile: gout/tolithiasis, no neurological deficit	Thiopurine nucleotides↑ (RBC)	Dose adjustment
Xanthine dehydrogenase deficiency (xanthinuria I)	Severe combined immunodeficiency (occurs in ADA, PNP and HPRT)	(hypo-)xan↑, UA↓	High fluid intake, low-purine diet
	6-Azathioprine and mercaptopurine toxicity		
	Xanthine lithiasis, acute renal failure, UTL, myopathy, arthritis, arthralgia, sometimes mental retardation		

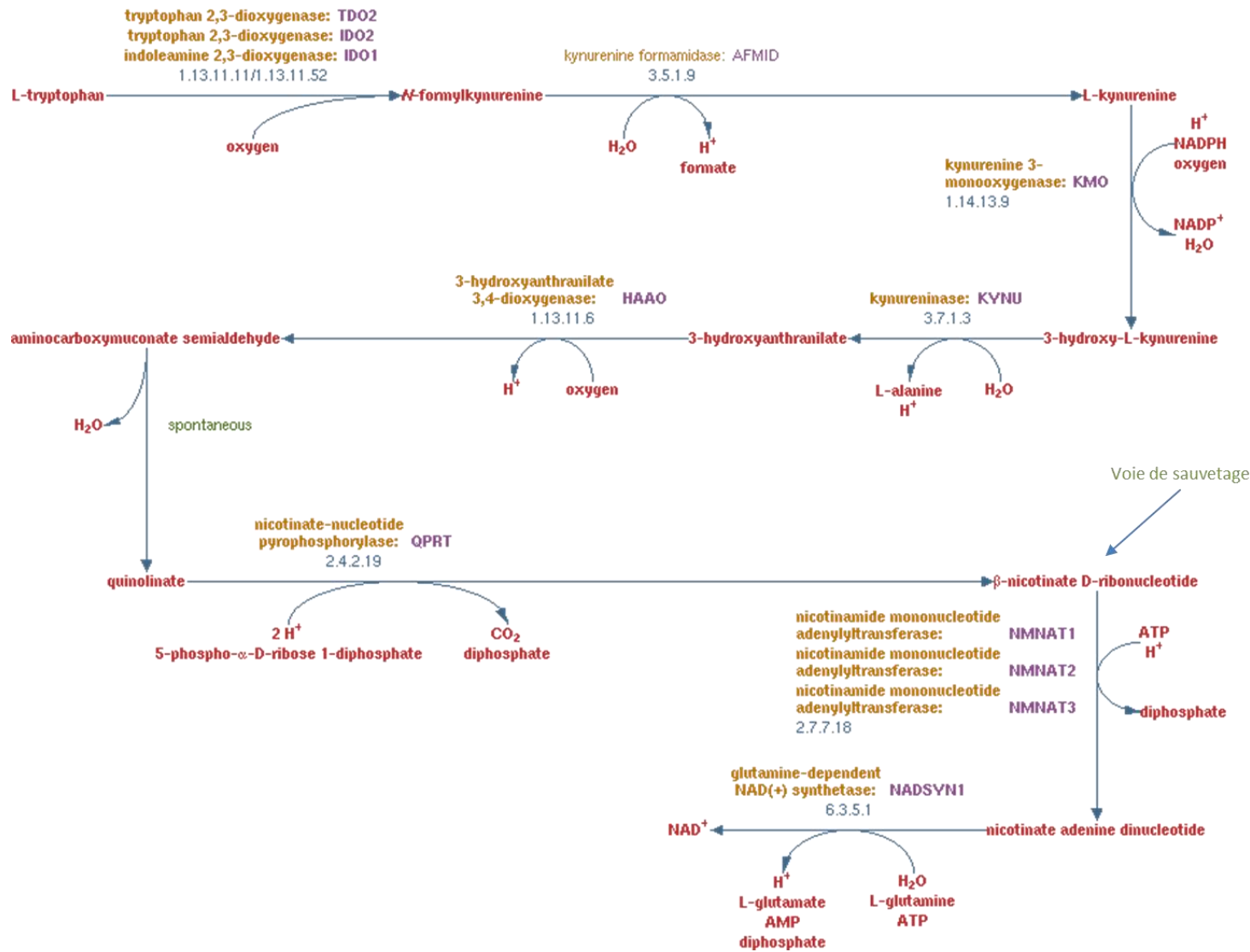
Table 3 Inborn errors of pyrimidine metabolism

Defect (abbreviation)	Clinical manifestations	Diagnostic metabolites	Treatment
Activation-induced cytidine deaminase deficiency (hyper IgM syndrome type II)	Recurrent bacterial infections, lymphoid hyperplasia, defective Ig class switching	None	Control of infections
CTP phosphocholine cytidyltransferase deficiency (CTP-CT deficiency) (RBC)	Haemolytic anaemia	CDP-choline + CDP-ethanolamine↑	Not established
Dihydropyrimidinase deficiency (dihydropyrimidinuria)	Variable neurological symptoms, epilepsy, dysmorphic features, mental retardation, severe toxicity to 5-fluorouracil	dhU↑, dhT↑, U↑, T↑	Withdrawal of offending drug
Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency (thymine-uraciluria)	Variable neurological symptoms, spastic quadriplegia, microcephaly, severe toxicity to 5-fluorouracil	U↑, T↑	Withdrawal of offending drug
Thymidine kinase 2 deficiency	Mitochondrial depletion syndrome (myopathic form)	mtDNA depletion	Not established
Thymidine phosphorylase deficiency (MNGIE)	MNGIE syndrome, ocular and skeletal myopathy with gastrointestinal symptoms	Thymidine↑, uridine↑, deoxyuridine↑, mtDNA depletion	Not established
Uridine monophosphate hydrolase deficiency (pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency; UMPH-1 deficiency)	Non-spherocytic haemolytic anaemia with basophilic stippling, splenomegaly	Pyrimidine nucleotides↑ (RBC)	Splenectomy
Uridine monophosphate hydrolase superactivity (5'-nucleotidase superactivity, UMPHS)	Developmental delay, fits, seizures, hyperactivity, alopecia, recurrent infections	UA↓	Uridine
Uridine monophosphate synthase deficiency (orotic aciduria):			Uridine
• Orotate phosphoribosyltransferase deficiency (OA type I)	• Hereditary oroticaciduria, megaloblastic anaemia, occasional	• OA↑	
• Orotidylic acid decarboxylase deficiency (OA type II)	• Immunodeficiency neurological abnormalities, failure to thrive, crystalluria, no anaemia	• OA↑, Or↑	
Ureidoprotonase deficiency (NC-BALA amidohydrolase deficiency)	Hypotonia, developmental delay, seizures, optic atrophy, scoliosis, acute life-threatening events	dhU↑, dhT↑, NC-BALA↑, NC-BAIB↑	Not established

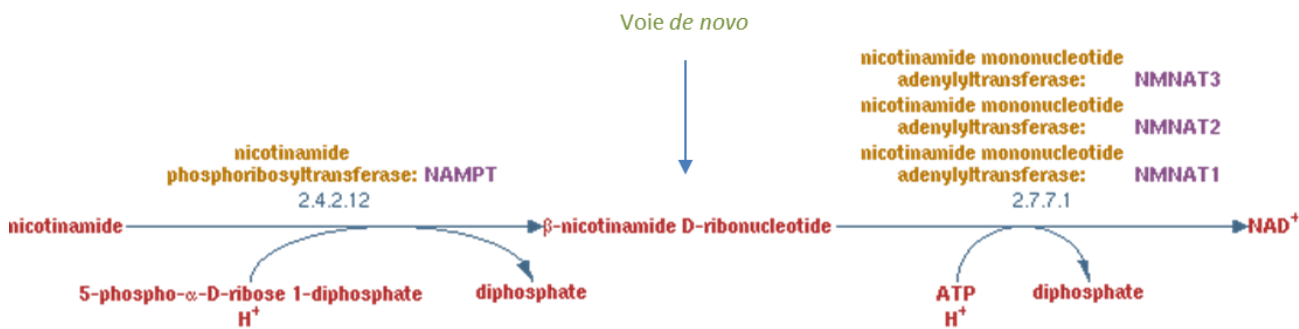
Voies de biosynthèse du NAD⁺

D'après « HumanCyc database »

Voie de synthèse *de novo* du NAD⁺



Voie de synthèse de « sauvetage » du NAD⁺



Descriptions des modèles cellulaires utilisés au laboratoire

Descriptions des modèles cellulaires utilisés au laboratoire							
Noms des lignées cellulaires	Origines	Antibiotiques	Vecteurs intégrés	Statut BLM	Statut CDA	Statut PARP-1	Références
BS-Ctrl _(BLM)	GM8505B (dérivé de patient BS)	G418	EGFP-C1	-	-	+	Chabosseau et al., 2011
BS-BLM			EGFP-C1-BLM	+	+	+	
BS-BLM1841T			EGFP-C1-BLM 1841T	+	-	+	
BS-Ctrl _(CDA)	BS-Ctrl _(BLM)	G418 + puromycine	EGFP-C1 + pCI	-	-	+	
BS-CDA			EGFP-C1 + pCI-CDA	-	+	+	
BS-BLM-Ctrl	BS-BLM	G418 + puromycine	EGFP-C1-BLM + pCI	+	+	+	Gemble et al., 2015
BS-BLM-CDA			EGFP-C1-BLM + pCI-CDA	+	+	+	
Hela-Ctrl _(CDA)	Hela	Puromycine	pGIPZ	+	+	+	
Hela-shCDA			pGIPZ-shCDA	+	-	+	
Hela-Ctrl _(PARP-1)	Hela	Hygromycine B	PEBV	+	+	+	Godon et al., 2088
Hela-shPARP-1			PEBV-shPARP-1	+	+	-	

Rouzeau et al., Plos One, 2012 :

**Les hélicases BLM et PICH coopèrent
avec la topoisomérase II α dans la
disjonction des centromères avant
l'anaphase**

Bloom's Syndrome and PICH Helicases Cooperate with Topoisomerase II α in Centromere Disjunction before Anaphase

Sébastien Rouzeau^{1,2}, Fabrice P. Cordelières^{1,2,3}, Géraldine Buhagiar-Labarchède^{1,2}, Ilse Hurbain^{4,5,6}, Rosine Onclercq-Delic^{1,2}, Simon Gemble^{1,2}, Laura Magnaghi-Jaulin⁷, Christian Jaulin⁷, Mounira Amor-Guérét^{1,2*}

1 Institut Curie, Centre de Recherche, Centre Universitaire, Bât Orsay, France, **2** CNRS UMR3348, Stress Génotoxiques et Cancer, Orsay, France, **3** Institut Curie, Centre de Recherche, Plateforme d'Imagerie Cellulaire et Tissulaire IBISA, Centre Universitaire, Bât Orsay, France, **4** Institut Curie, Centre de Recherche, Paris, France, **5** Structure et Compartimentation membranaire, CNRS UMR144, Paris, France, **6** Plateforme d'Imagerie Cellulaire et Tissulaire IBISA, CNRS UMR 144, Paris, France, **7** Institut de Génétique et Développement, CNRS UMR 6290, Université de Rennes 1, Rennes, France

Abstract

Centromeres are specialized chromosome domains that control chromosome segregation during mitosis, but little is known about the mechanisms underlying the maintenance of their integrity. Centromeric ultrafine anaphase bridges are physiological DNA structures thought to contain unresolved DNA catenations between the centromeres separating during anaphase. BLM and PICH helicases colocalize at these ultrafine anaphase bridges and promote their resolution. As PICH is detectable at centromeres from prometaphase onwards, we hypothesized that BLM might also be located at centromeres and that the two proteins might cooperate to resolve DNA catenations before the onset of anaphase. Using immunofluorescence analyses, we demonstrated the recruitment of BLM to centromeres from G2 phase to mitosis. With a combination of fluorescence *in situ* hybridization, electron microscopy, RNA interference, chromosome spreads and chromatin immunoprecipitation, we showed that both BLM-deficient and PICH-deficient prometaphase cells displayed changes in centromere structure. These cells also had a higher frequency of centromeric non disjunction in the absence of cohesin, suggesting the persistence of catenations. Both proteins were required for the correct recruitment to the centromere of active topoisomerase II α , an enzyme specialized in the catenation/decatenation process. These observations reveal the existence of a functional relationship between BLM, PICH and topoisomerase II α in the centromere decatenation process. They indicate that the higher frequency of centromeric ultrafine anaphase bridges in BLM-deficient cells and in cells treated with topoisomerase II α inhibitors is probably due not only to unresolved physiological ultrafine anaphase bridges, but also to newly formed ultrafine anaphase bridges. We suggest that BLM and PICH cooperate in rendering centromeric catenates accessible to topoisomerase II α , thereby facilitating correct centromere disjunction and preventing the formation of supernumerary centromeric ultrafine anaphase bridges.

Citation: Rouzeau S, Cordelières FP, Buhagiar-Labarchède G, Hurbain I, Onclercq-Delic R, et al. (2012) Bloom's Syndrome and PICH Helicases Cooperate with Topoisomerase II α in Centromere Disjunction before Anaphase. PLoS ONE 7(4): e33905. doi:10.1371/journal.pone.0033905

Editor: Beth A. Sullivan, Duke University, United States of America

Received: November 4, 2011; **Accepted:** February 19, 2012; **Published:** April 26, 2012

Copyright: © 2012 Rouzeau et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the Institut Curie (PIC), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Cancéropôle/Région Ile-de-France, the Ligue contre le Cancer Grand-Ouest, the Association pour la Recherche sur le Cancer (1071), the Agence Nationale de la Recherche (EpiCentri) and by fellowships from the Ministère délégué de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and from the Ligue Nationale contre le Cancer. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: mounira.amor@curie.fr

Introduction

The centromere is a highly differentiated chromosomal structure consisting, in human cells, of α -satellite DNA repeats [1]. It plays an essential role in cell division, particularly in kinetochore assembly, and in ensuring the segregation of equal number of chromosomes to daughter cells during mitosis [2]. The maintenance of centromere stability is thus essential to prevent chromosomal instability and cancer development [3]. Our interest in centromere stability began with the unexpected discovery that a helicase-like protein, PICH (Plk1-interacting checkpoint "helicase") and the Bloom syndrome helicase (BLM) colocalized to centromeric ultrathin DNA threads that could not be counterstained with conventional DNA dyes or antibodies against histones

[4,5]. These threads were found to be common in all cultured normal cells tested, and are therefore probably physiological structures. These PICH- and BLM-positive DNA threads, which are also called ultrafine anaphase bridges (UFBs), are thought to contain unresolved DNA catenations between the centromeres separating during anaphase or to originate from incompletely replicated DNA [4,5]. Almost all the UFBs detected in untreated cells are of centromeric origin and have been proposed to prevent reactivation of the spindle assembly checkpoint (SAC) during early anaphase, by maintaining tension across centromeres [4,6]. As cells progress through anaphase, UFBs become progressively longer and decrease in number. They are no longer detectable by telophase. The resolution of centromeric UFBs requires topo-

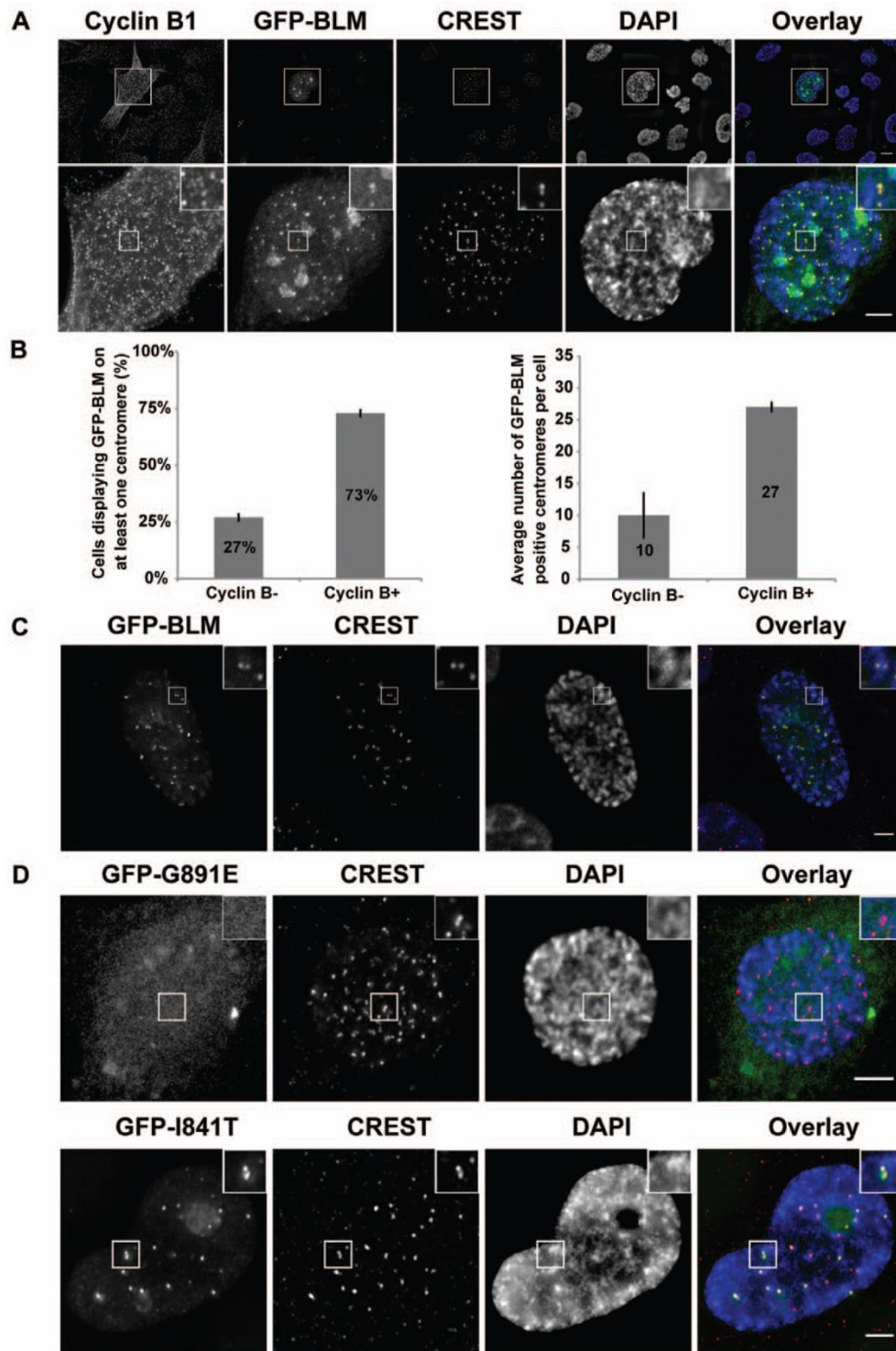


Figure 1. GFP-BLM localizes to centromeres in G2/prophase cells. (A) Localization of GFP-BLM (green) to centromeres in late G2 cells. Nuclei were visualized by DAPI staining (blue). G2 cells were stained with antibodies against cyclin B1. Cells were stained with CREST serum to visualize centromeres (red). Lower panels are the magnification of the corresponding upper panels. Scale bar = 5 μ m. (B) Two hundred cells with GFP-BLM-positive centromeres were analyzed by staining for cyclin B1 (cyclin B- or cyclin B+). The percentage of cells in each category is indicated (left panel),

together with the mean number of GFP-BLM-positive centromeres per cell (right panel). Bars indicate the standard deviation (SD). (C) Localization of GFP-BLM (green) to centromeres (red) in prophase cells. The nucleus and centromeres were visualized as in A. Scale bar = 5 μ m. (D) Localization of GFP-BLM (green) with an inactive helicase domain (GFP-I841T) or with both the helicase and DNA-binding domains inactivated (GFP-G891E). Nuclei and centromeres were visualized as in A. Scale bar = 5 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0033905.g001

isomerase II α (Topo II α) activity and occurs after the onset of anaphase, after the disappearance of cohesin [6,7]. Thus, sister centromeres are held together through double-stranded DNA catenations until the end of anaphase, accounting for the strong induction of centromeric UFBs by catalytic inhibitors of Topo II [4,5]. The frequency of PICH-positive UFBs is also higher in BLM-deficient cells than in control cells, suggesting the involvement of BLM in their resolution [5]. This point is of particular interest because BLM deficiency causes Bloom's syndrome, an autosomal recessive disease displaying one of the strongest known correlations between chromosomal instability and an increase in the risk of cancer at an early age [8]. The hallmark of BLM-deficient cells is a high frequency of sister chromatid exchanges (SCEs) [8]. Thus, BLM plays a crucial role in preventing genetic instability and cancer. In normal cells, BLM is detected only on UFBs in anaphase, whereas PICH staining is detected as early as metaphase [5]. PICH is required for the localization of BLM to anaphase UFBs, and BLM is required for the chromatin remodeling function of PICH *in vivo*, the two proteins cooperating to limit histone incorporation into UFBs and to promote their resolution [9]. We hypothesized that the functional relationship between PICH and BLM might also be of major importance before anaphase in the maintenance of centromere integrity.

We report here the localization of BLM to the centromere of chromosomes from G2 phase to mitosis. We show that PICH and BLM deficiencies are associated with changes in centromere structure, with an increase in centromeric non disjunction in cohesin-depleted cells and a defect in the recruitment of active Topo II α to centromeres. Our results reveal the existence of a new centromeric mechanism involving cooperation between PICH and BLM, likely to render some centromeric catenates accessible to Topo II α before anaphase onset, thereby facilitating correct centromeric disjunction and preventing the formation of supernumerary UFBs.

Results

BLM is a Centromeric Protein

PICH is a centromeric protein [4]. As BLM, like PICH, localized with centromeric UFBs [5], we first investigated whether BLM also localized to centromeres. We analyzed the subcellular distribution of stably expressed GFP-tagged BLM protein in asynchronous GM08505 BS cells (GFP-BLM cells) [10]. We detected GFP-BLM in PML bodies, as expected [11] (Figure S1), but in some cells, BLM foci were smaller, double-dotted and no longer colocalized within PML bodies. Using CREST serum as a centromeric marker, we showed, by cyclin B1 staining [12], that 73% of cells with GFP-BLM-positive centromeres were in G2-phase or early mitosis (Figure 1A and 1B, left panel). These cells included a mean of 27 GFP-BLM-positive pairs of centromeres (7 to 59 pairs). By contrast, only 10 GFP-BLM-positive centromeres (1 to 24 pairs) were detected in late S-phase cells (most centromeres being paired), negative for cyclin B1 staining (Figure 1B, right panel). All the centromeres in prophase cells displayed positive staining for GFP-BLM (Figure 1C). These results suggest that BLM is progressively loaded to the centromeres from late S phase until mitosis. We then investigated whether the helicase and/or DNA binding activities of BLM were required for

centromeric localization, using GM08505 BS cells stably transfected with a construct encoding either the BLM protein with an inactive helicase domain (GFP-I841T) or with both the helicase and DNA binding domains inactivated (GFP-G891E) [13]. We found that DNA-binding activity was required for the centromeric localization of BLM, whereas helicase activity was not. Indeed, GFP-G891E displayed a diffuse distribution in BS cells and was not detectable at centromeres, suggesting that BLM may interact with centromeric DNA (Figure 1D).

The centromeric localization of endogenous BLM was also investigated in immunofluorescence experiments with two different anti-BLM antibodies, on mitotic chromosome spreads from HeLa S3 cells at prometaphase/metaphase stage, downregulated for BLM (siBLM) or without BLM downregulation (siCtrl). In HeLa siCtrl cells, we detected endogenous BLM at centromeres, with CREST serum used as a centromeric marker. The siRNA-mediated depletion of BLM (siBLM) resulted in the absence of the BLM signal at centromeres, confirming the specificity of the anti-BLM antibodies (Figure 2A). Closer examination of the centromeres of each chromosome showed the BLM signal to be present on about 84% of centromeres in HeLa siCtrl cells and on 1.7% of centromeres from HeLa siBLM cells (Figure 2B). Thus, BLM is clearly a centromeric protein.

BLM and PICH Deficiencies are Associated with Changes in Centromeric DNA Structure

We investigated the possible effects of BLM deficiency on centromere structure. We used a FISH (fluorescence *in situ* hybridization)-based assay to investigate the centromeric DNA organization of one chromosome and its volume (chromosome 8, CEN-8 probe [14]) in GM08505 BLM-deficient cells stably expressing a GFP vector (BS cells) and in GFP-BLM cells during prometaphase and metaphase (Figure 3A). We found that CEN-8 signal volume in BS cells was less than half that in control cells, indicating that BLM is involved in centromeric DNA structure (Figure 3B, left panel). For confirmation of these findings, we analyzed the effects of BLM deficiency on the structural morphology of the centromeric DNA in BS and GFP-BLM metaphase cells by electron microscopy (EM) (Figure 3C). Centromeric chromatin was identified adjacent to the typical kinetochore structure. Immunofluorescence analysis of several kinetochore/centromere markers confirmed that BLM deficiency had no major effect on kinetochore structure, as previously shown for PICH-deficient cells [4] (Figure S2). However, the centromeric chromatin was clearly more dense in BS cells than in GFP-BLM cells (Figure 3C), confirming an effect on centromeric DNA organization of the absence of BLM. We next performed FISH experiments in GFP-BLM cells downregulated for PICH (siPICH) or without PICH downregulation (siCtrl). We found that CEN-8 signal volume in PICH-downregulated cells was about half that in control cells, indicating that PICH is also involved in centromeric DNA structure before anaphase onset (Figure 3B, right panel). These results are not the consequence of a coregulation of *PICH* and *BLM* genes, because the deficiency of one protein did not affect the expression of the other (Figure 4A, lower left panel). Finally, CEN-8 signal volume in HeLa cells depleted of BLM, PICH or both proteins was significantly lower than that in control cells (Figure S3). There was therefore no additive or synergistic

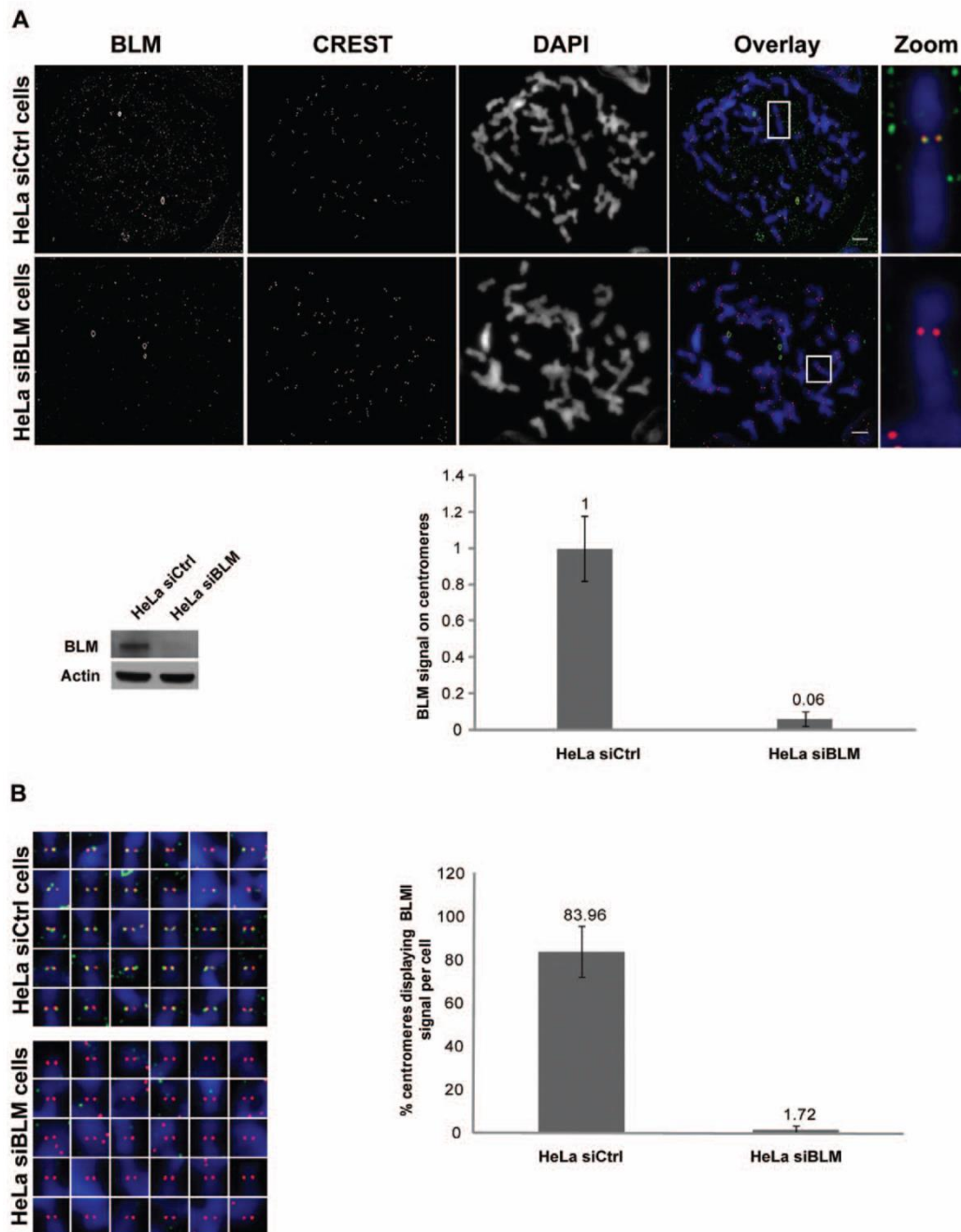


Figure 2. BLM localizes to centromeres in mitotic cells. (A) Endogenous BLM localizes to centromeres in HeLa cells. Wide-field microscopy after immunofluorescence staining on chromosome spreads obtained by cyto centrifugation of BLM siRNA-transfected or control siRNA-transfected HeLa S3 cells. Staining is shown for BLM (green), CREST (red) and chromosomes (blue). Single chromosome magnifications are shown (upper panels). Proteins levels were assessed by immunoblotting, probing the same membrane with anti-BLM (ab-476) antibody and then with anti- β actin antibody, as a loading control (lower left panel). Quantification of centromeric fluorescence signals for BLM (normalized according to the CREST signal) for a total of 20 centromeres in control cells (siCtrl) and 24 centromeres in BLM-depleted cells (siBLM) from two independent experiments, demonstrate the specificity of ab476 BLM antibodies (lower right panel). Data are means and SD normalized with respect to controls. Scale bar = 5 μ m. (B) Centromeres detected with CREST serum (red) from all the chromosomes of HeLa siCtrl cells and HeLa siBLM cells from Figure 2A were analyzed for BLM signals (green). Chromosomes were visualized by DAPI staining (blue) (left panels). The same analysis was performed on a total of 9 HeLa siCtrl cells and 9 HeLa siBLM cells from two independent experiments: the percentage of centromeres giving a BLM signal is shown (right panel). doi:10.1371/journal.pone.0033905.g002

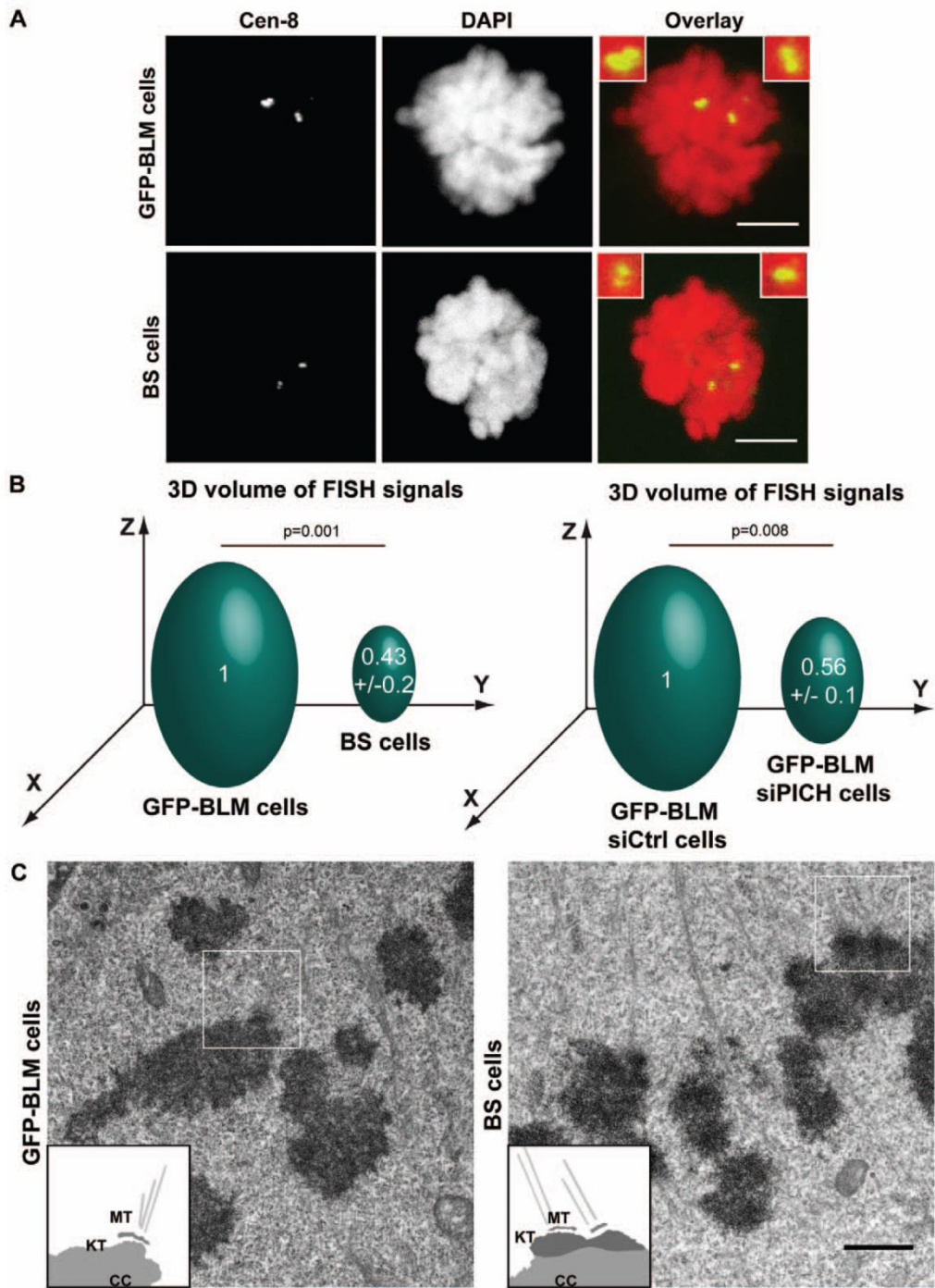


Figure 3. Structural defects at the centromeres in BLM- and PICH-deficient cells. (A) FISH with the CEN-8 probe (green) on metaphase BS and GFP-BLM cells. Chromosomes are visualized by DAPI staining (red). Bar = 5 μ m. (B) Comparison of the volume of the centromeric FISH signal detected on chromosomes 8 from GFP-BLM (defined as 1) and BS cells (left panel) and from GFP-BLM cells with (siPICH) and without (siCtrl) PICH downregulation (defined as 1) (right panel). We analyzed 45 metaphase cells from three independent experiments for each cell line. (C) GFP-BLM cells (left panel) and BS cells (right panel) were processed for electron microscopy. Scale bar = 1 μ m. Inset: schematic diagram of the regions of interest (white squares) (MT: microtubules, KT: kinetochore outer plate and CC: centromeric chromatin). Eight centromeres from two independent experiments were analyzed.
doi:10.1371/journal.pone.0033905.g003



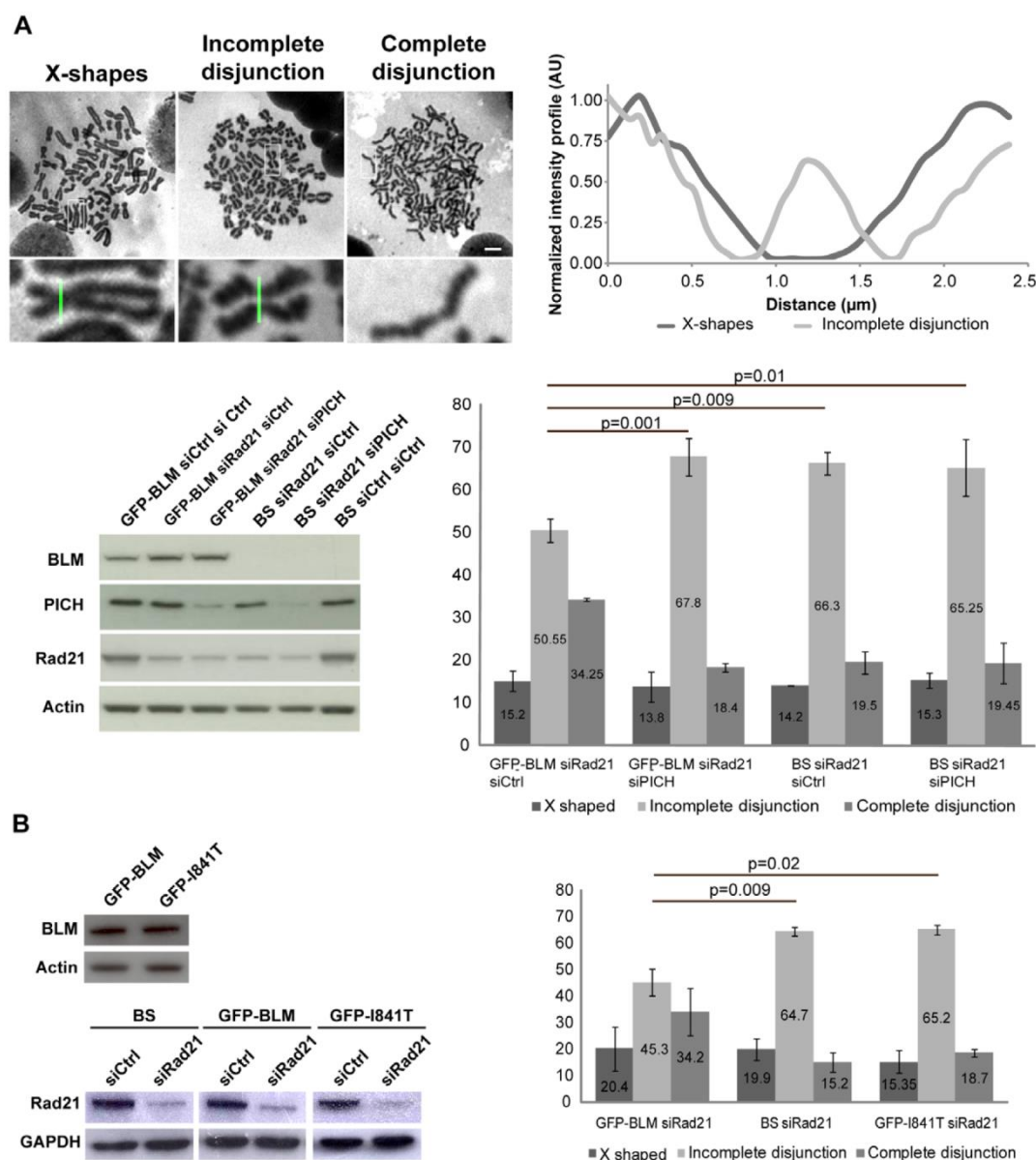


Figure 4. BLM-deficient cells and PICH-downregulated display non disjunction of centromeres and impaired recruitment of active Topo IIa to centromeres. (A) GFP-BLM and BS cells were transfected for 72 hours with Rad21 siRNAs and transfected either with control siRNAs or with PICH siRNAs. BLM, PICH and Rad21 proteins levels were assessed by immunoblotting, probing the same membrane with anti-BLM (ab-476), anti-PICH and anti-Rad21 antibodies and with anti- β actin antibody, as a loading control (lower left panel). Chromosome spreads were performed and sorted on the basis of their phenotype: X-shapes, incomplete disjunction or complete disjunction. The scale bars indicate 5 μ m (upper left panel). This classification is based on the intensity profiles of centromeres (upper right panel). We analyzed 500 spreads from three independent experiments for each cell line. The frequency of each phenotype, in each of the three cell lines, is shown in the histogram (lower right panel). Bars represent SD. (B) GFP-BLM, BS and GFP-1841T cells were transfected for 72 hours with Rad21 siRNAs and the same experiments as in (A) (right panels) were carried out. We checked the levels of BLM and Rad21 proteins by western blotting (left panels).
doi:10.1371/journal.pone.0033905.g004

effect of the depletion of BLM and PICH on CEN-8 signal volume, suggesting that these proteins are involved in the same regulatory pathway. These results also confirmed the involvement of BLM and PICH in centromeric DNA structure before anaphase onset.

BLM and PICH are Required for Complete Centromere Disjunction

As BLM localizes to centromeres (Figures 1 and 2), we investigated whether, in addition to its potential role in resolving UFBs during anaphase [5,15], BLM might be involved in

preventing UFB formation, by contributing to the centromeric DNA decatenation process before the metaphase-anaphase transition. DNA catenation induced by the inhibition of Topo II α has been shown to maintain sister chromatid cohesion in the absence of cohesin complexes [7,16]. We thus analyzed chromosome spreads from BS cells and from GFP-BLM cells arrested in prometaphase (+colchicine), with (siPICH) or without (siCtrl) PICH knockdown (Figure 4A). For these experiments, Rad21, the cleavable subunit of cohesin, was depleted from all cell lines (siRad21) (Figure 4A, lower left panel). BLM deficiency and PICH knockdown were associated with an increase in centromeric cohesion. Indeed, we observed three distinct and different phenotypes: classical X-shaped chromosomes probably corresponding to cells not transfected with Rad21 siRNA (X-shapes), the expected fully disjoined chromatids resulting from cohesin depletion (complete disjunction), and a third, unusual phenotype of separated sister chromatids that were still physically linked, reflecting incomplete chromatid disjunction (incomplete disjunction) (Figure 4A, upper left panels). Careful examination of these “separated but still paired” chromatids revealed that they were mostly linked via their centromeres (visualized as the major chromosomal constriction). This observation was confirmed by quantifying the intensity profiles of the centromeric region between the two chromatids of the “X-shape” and “incomplete disjunction” phenotypes (Figure 4A, upper right panel). We determined the frequency of each phenotype in the four cell lines and found that about 15% of the prometaphase cells presented the X-shaped phenotype. About 19% of siRad21-treated BS cells, siRad21+siPICH treated GFP-BLM cells, and siRad21+siPICH-treated BS cells presented completely disjoined chromatids, whereas about 66% of these cells, displayed an incomplete centromere disjunction phenotype (Figure 4A, lower right panel). By contrast, in GFP-BLM cells with Rad21 knockdown only, 34.2% of the cells displayed complete sister chromatid disjunction and 50.5% had separated sister centromeres that remained paired (as opposed to the 66% observed in the other cell lines). Similar results were obtained in Rad21-depleted HeLa cells, with a significantly higher frequency of cells presenting an “incomplete disjunction” phenotype and a significantly lower frequency of cells presenting a “complete disjunction” phenotype in cells depleted of BLM or PICH (Figure S4). Rad21 levels were initially similar in GFP-BLM cells and in HeLa cells and siRNA-mediated Rad21 downregulation was similarly effective in all cell lines. The differences in the percentage of cells with an incomplete disjunction phenotype therefore did not reflect differences in the efficacy of siRNA-mediated Rad21 downregulation (Figure S5). Finally, we performed the same chromosome spread analysis with GFP-BLM-I841T cells (inactive helicase domain), comparing the results with those for BS and GFP-BLM cells. Similar results were obtained with both Rad21-depleted GFP-BLM-I841T cells and Rad21-depleted BS cells, (Fig. 4B right panel), despite GFP-BLM-I841T and GFP-BLM cells having similar amounts of BLM protein (Figure 4B, left panel).

Together, these results show that both BLM and PICH are involved in the complete disjunction of sister centromeres independently of the cohesin pathway, strongly suggesting that in the absence of BLM and/or PICH, some centromeric catenations are not processed, leading to an increase in centromeric non disjunction. The results for cells expressing BLM with an inactive helicase domain indicate that the helicase activity of BLM is involved in the complete disjunction of sister centromeres.

Lastly, we observed no additive or synergistic effect of PICH and BLM deficiencies on the “incomplete disjunction” phenotype,

suggesting that these two proteins are involved in the same regulatory pathway.

Centromeric UFBs are not Detectable in PICH-depleted Cells

The findings reported above suggest that the higher frequency of centromeric UFBs in BLM-deficient cells [5], which we also confirmed, may be due to a lack of BLM processing activity of some centromeric DNA catenations. These results also suggest that the centromeric DNA catenations persisting in PICH-deficient cells probably result in an increase in centromere UFB frequency. We investigated the effect of PICH knockdown on the frequency of UFBs, by monitoring BLM. We found that PICH depletion resulted in a three-fold decrease in the number of cells presenting UFBs and in a five-fold decrease in the number of BLM-positive UFBs (Figure S6A and S6B). However, most of the BLM-positive UFBs detected were also positive for PICH staining, indicating that PICH downregulation was incomplete, with UFBs positive for both BLM and PICH probably forming in cells not efficiently transfected with PICH siRNA. Only a minor fraction of UFBs (5–6%) were positive for BLM staining and negative for PICH staining and the frequency of these UFBs was not affected by PICH downregulation (Figure S6B). The lack of detection of an increase in the frequency of BLM-positive UFBs in PICH-depleted anaphase cells can be accounted for by recent observations showing that PICH is required for BLM localization to anaphase threads [15]. Nevertheless, we cannot exclude the possibility that UFBs may be prematurely disrupted in the absence of PICH, as previously suggested [4], or that they may not form at all. We were unable to visualize UFBs in the absence of PICH, even by BrdU staining, probably due to the inherent limitations of this method [17]. However, as PICH downregulation is associated with an increase in the frequency of cells presenting an “incomplete disjunction” phenotype, UFB frequency is probably higher in these cells, although these structures are not detectable in the absence of PICH.

BLM and PICH are Required for the Recruitment of Topo II α to Centromeres

Topo II α is known to be responsible for the elimination of centromeric DNA catenation [16]. We investigated the possible role of BLM and PICH in centromeric decatenation, by assessing the recruitment of active Topo II α to the pericentromeric region (satellite 3) and to the centromere of chromosomes X (α -satellite sequences DXZ1) and 17 (D17Z1). Topo II α was trapped on DNA by 15 minutes of treatment with etoposide [18], and analyzed by chromatin immunoprecipitation (ChIP) coupled to semi-quantitative PCR (see Methods) in BS cells and GFP-BLM cells (Figure 5A) and in PICH-depleted GFP-BLM cells (siPICH) and their control cells (siCtrl) (Figure 5B). Immunoprecipitation of active Topo II α in BS cells, PICH-depleted GFP-BLM cells and their respective control cells resulted in similar amplification of satellite 3 (Figure 5A and 5B, lower panels). We then used this as a control for normalization and found that the amounts of DXZ1 and D17Z1 amplified sequences were four and two times higher, respectively, in GFP-BLM control cells than in BS cells (Figure 5A, upper panel). DXZ1 and D17Z1 sequences bound to active Topo II α were also twice as abundant in control cells as in PICH-depleted cells (Figure 5B, upper panel), whereas the total amount of Topo II α was similar in all conditions (Figure 5C). We performed the same analysis with GFP-I841T cells, comparing the results obtained with those for BS and GFP-BLM cells, and obtained similar results for GFP-I841T cells and BS cells

(Figure 5D). Thus, active Topo II α is significantly less abundant at the centromeres of BLM-deficient cells and PICH-deficient cells than at those of control cells. These results also indicate that the helicase activity of BLM is involved in the recruitment of active Topo II α to centromeres.

Discussion

We report here a new localization and function for BLM at centromeres. We also report that BLM cooperates with PICH at centromeres, and that both these proteins play an important role in a previously unknown mechanism involving the recruitment of active Topo II α to centromeres to eliminate DNA catenation before the onset of anaphase.

Our FISH experiments and EM images showed changes in the structure of centromeric chromatin in the absence of BLM or PICH (Figure 3). Recombinant PICH has recently been shown to have nucleosome remodeling activity *in vitro*, and BLM has been shown to be required for the chromatin remodeling function of PICH during anaphase *in vivo* [15]. On the other hand, changes in DNA topology are required for efficient mitotic decatenation by Top2, the fission yeast homolog of Topo II α [19]. We therefore propose a model in which the combined action of BLM and PICH promotes the organization of centromeric chromatin, thereby rendering some centromeric catenates accessible to Topo II α (Figure 6). This pathway may allow the Topo II α -mediated resolution of some centromeric DNA catenations as soon as the cells enter prometaphase, thereby preventing centromeric non disjunction and the potential formation of additional UFBs that might interfere with abscission [7].

Our results also indicate that, in addition to their role in resolving physiological UFBs [5,15], BLM and PICH may participate in the prevention of UFB formation. Thus, the additional centromeric UFBs that form in BLM-deficient cells or in cells treated with inhibitors of the catalytic activity of Topo II α may include both newly formed UFBs and unresolved physiological UFBs: these UFBs are probably similar in nature but of different origins. Indeed, cohesin complexes preserve catenation at centromeres until the onset of anaphase, accounting for the presence of physiological UFBs [7]. The resolution of centromeric catenation therefore depends on cohesin removal [7]. However, our results indicate that some centromeric catenations are processed before the onset of anaphase to prevent the formation of additional UFBs. Thus, physiological UFBs may arise from catenations locally protected by cohesin complexes and processed at anaphase onset, whereas additional UFBs may arise from catenations not resolved at an earlier step.

In conclusion, the new centromeric decatenation mechanism reported here is probably the first step in a two-step centromeric decatenation process dependent on the coordinated action of BLM, PICH and Topo II α . Moreover, our studies shed light on the mechanisms underlying the genetic instability and predisposition to cancer associated with Bloom's syndrome.

Materials and Methods

Cell Lines, Cell Culture and Transfections

The GFP-BLM construct was kindly provided by Nathan Ellis. The SV40-transformed fibroblast cell line GM08505B, derived from the BS patient 42 (RaFr) of the Bloom's syndrome registry, was obtained from the NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository (Camden, NJ, USA). BS and GFP-BLM cells were obtained by transfecting BS GM08505B cells with the EGFP-C1 vector alone (Clontech, Mountain View, CA), or with the same

vector containing the full-length BLM cDNA [20], respectively, in the presence of JetPEI reagent (Ozyme). GFP-I841T cells were obtained by transfecting BS GM08505B cells as described above, with the EGFP-C1 vector containing the full-length BLM cDNA mutated at codon 841 (see site-directed mutagenesis).

HeLa and HeLa S3 cells, obtained from the American Tissue Culture Collection.

HeLaV cells and HeLashBLM cells were obtained by transfecting cells with an empty pSM2 vector or with the same vector encoding a short hairpin RNA sequence directed against BLM (Open Biosystems, clone V2HS-89234), respectively, with JetPEI reagent. After 48 h, selection with 1 to 5 μ g/ml puromycin (Invivogen) was applied. Individual colonies were isolated and cultured in medium containing 0.5 μ g/ml puromycin [10,21].

All cell lines were cultured in DMEM (Gibco) supplemented with 10% decomplemented FCS (Invitrogen), L-glutamine and antibiotics.

Cells were transfected with siRNAs directed against BLM (48 h), PICH (72 h) and Rad21 (72 h) (ON-TARGETplus, SMARTpool, Dharmacon) and with a control non-targeting pool of siRNA (ON-TARGETplus siCONTROL Non Targeting Pool, Dharmacon) (100 nM final concentration) in the presence of Dharmafect 1 (Dharmacon) according to the manufacturer's instructions. The sequences of all siRNA oligonucleotides used are presented in Table S1. The pool of siRNAs targeting PICH has been shown to have no effect on nocodazole-induced SAC (spindle assembly checkpoint) activation [22].

Chemicals

Etoposide (Sigma) was used at a final concentration of 0.5 mM.

Plasmid Construction and Site-directed Mutagenesis

Site-directed mutagenesis was performed with the EGFP-C1 vector containing the full-length BLM cDNA: Ile-841 and Gly-891 were mutated with the QuikChange XL site-directed mutagenesis kit (Agilent) according to the manufacturer's instructions.

Primer 1 (5'-CCCAGGGTACAGAAGGACACCCTGACT-CAGCTGAAG - 3') and primer 2 (5'-CTTCAGCTGAGT-CAGGGTGTCCCTTCTGTACCCTGGG- 3') were used to mutate Ile-841 and primer 3 (5'-GCACCACCCATATGATT-CAGAGATAATTACTGCCT- 3') and primer 4 (5'-AGG-CAGTAAATTATCTCTGAATCATATGGGTGGTG- 3') were used to mutate Gly-891.

Western-blot Analysis

Cells were lysed in 8 M urea buffer (8 M urea, 150 mM β -mercaptoethanol, and 50 mM Tris (pH 7.4) in water), sonicated and heated. Samples equivalent to 2.5 10^5 cells were subjected to electrophoresis in NuPAGE Novex 4–12% Bis-Tris precast gels (Invitrogen). The procedures used for immunoblotting have been described elsewhere [23].

Antibodies

All the commercial antibodies were used according to the manufacturers' specifications. The primary antibodies were used for immunofluorescence (IF), immunoprecipitation (IP) or immunoblotting (IB) at the following concentrations: rabbit anti-BLM (1:5000 for IB and 1:200 for IF, AB476 from Abcam), goat anti-BLM (1:150 for IF, C18 from Santa-Cruz Biotechnology), CREST serum (1:500 for IF, from Antibody Incorporated (Fig. 1), kindly provided by I. Bahon-Riedinger (Fig. 2)), mouse anti-cyclin B1 (1:500 for IF, sc-245 from Santa Cruz), mouse anti-Rad21 (1:1000 for IB, 53A303 from Upstate), mouse anti-Topo II α (1:1000

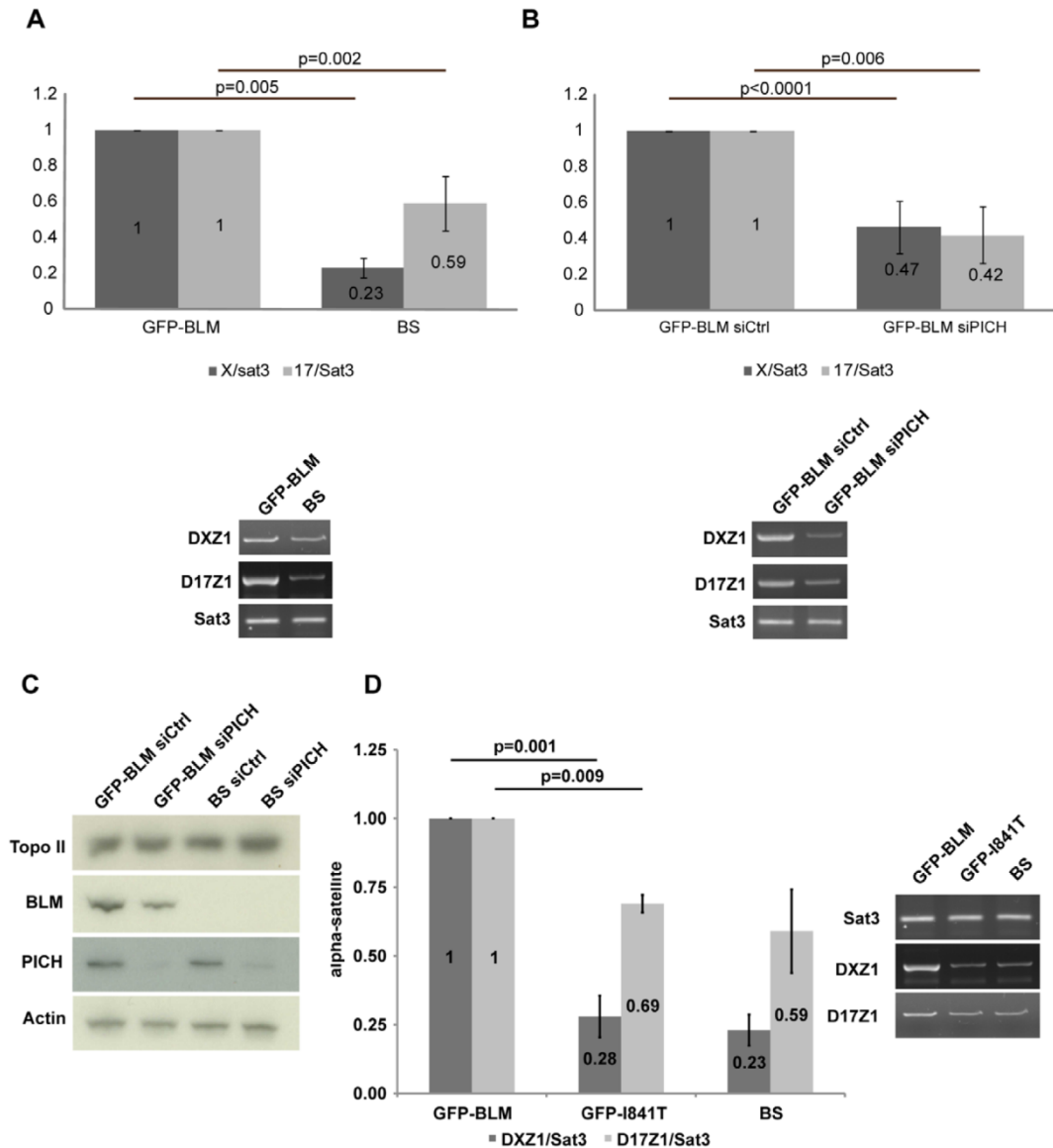


Figure 5. PICH and BLM are required for the recruitment of Topo IIα to centromeres (A) ChIP-PCR analysis of Topo IIα recruitment to pericentromeric region satellite 3 (Sat3) or to the centromeric DNA of chromosomes X (DXZ1) or 17 (D17Z1) was performed in GFP-BLM and BS cells (lower panels). The histogram shows relative enrichment in DXZ1 (DXZ1/Sat3) or D17Z1 (D17Z1/Sat3) sequences for active Topo IIα in GFP-BLM (defined as 1) and in BS cells (upper panels). The results presented are from three independent experiments. Error bars indicate the SD. (B) We performed the same experiments as in (A), with GFP-BLM cells transfected for 72 hours with control siRNAs or PICH siRNAs. (C) The amount of Topo II was evaluated in each cell line by western blotting. (D) We performed the same experiments as in (A), with GFP-BLM, GFP-I841T and BS cells.
doi:10.1371/journal.pone.0033905.g005

for IB and IF, 3D4 from Assay Design), mouse anti-Topo II alpha (1:250 for IP, KiS1 from Millipore), anti-β-actin (1:10000 for IB; Sigma), anti-GAPDH (1:10000 for IB; Millipore), anti-PICH (1:200 for IF and 1:750 for IB, DO1P from Abnova) and anti-CENP-A (1:200 for IF, AB13939 from Abcam). Secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 488, 555 and 633 (Molecular Probes, 1:200-600) were used for immunofluorescence and

secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (Santa Cruz, 1:5000-10000) were used for immunoblot detection.

Reverse Transcription and Real-time Quantitative PCR
Total RNA was extracted with the RNeasy Mini kit (Qiagen) including a DNase digestion step. cDNAs were synthesized with 250 ng of random hexamers (Invitrogen), 2 μg of RNA and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). qPCR experi-

BLM and PICH in Centromere Disjunction

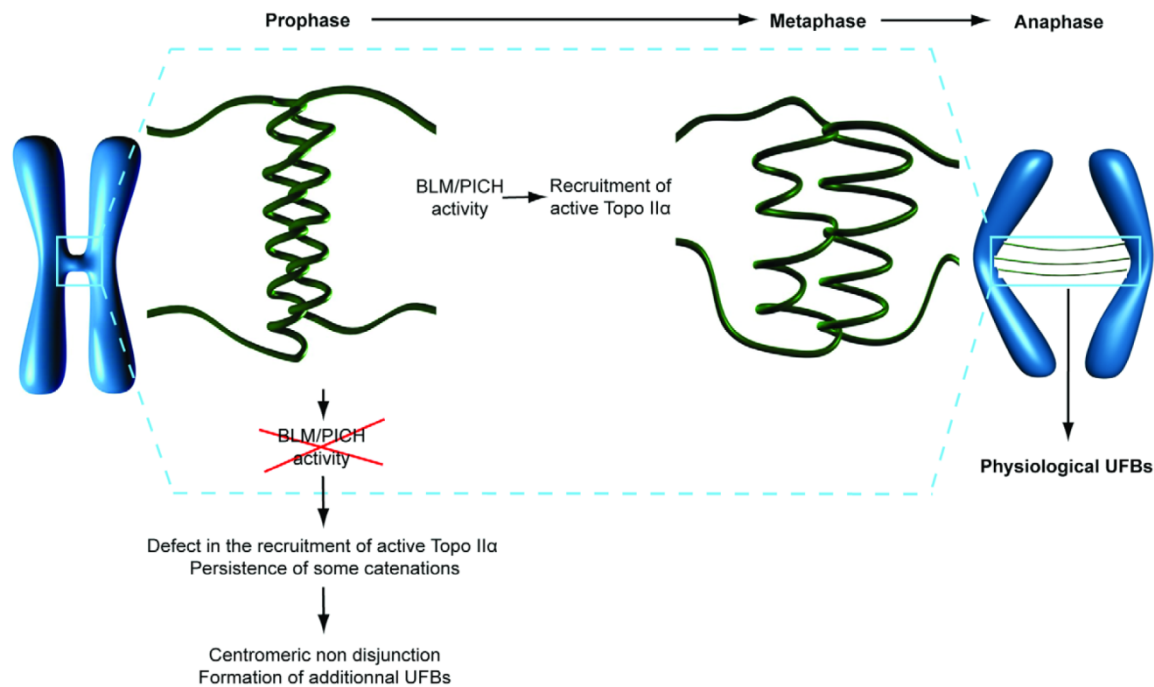


Figure 6. Model of PICH/BLM-dependent decatenation of centromeric DNA. We propose that the combined action of BLM and PICH promotes the organization of centromeric chromatin, thereby rendering some centromeric catenates accessible to Topo II α . In the absence of BLM or PICH, a defect in the recruitment of active Topo II α results in the persistence of some catenations leading to centromeric non disjunction and the formation of additional UFBs.

doi:10.1371/journal.pone.0033905.g006

ments were performed according to the MIQE Guidelines [24]. Amplification mixtures contained the cDNA template (1/100 dilution), SYBR Green Supermix 1 \times (BioRad) and 300 nM forward and reverse primers. Amplification was performed with the CFX96 detection system (BioRad). The primer sequences for Rad21 have been described on the website www.rtpimerdb.org (RTPrimerDB ID:8036). The relative quantities of the Rad21 cDNAs were normalized against two reference genes (RPL32, SDHA) chosen on the basis of their low M-value [25,26].

Immunofluorescence Microscopy

Immunofluorescence staining was performed as previously described [27] with the inclusion of a prepermeabilization incubation with 0.5% Triton X-100 before fixation for the detection of chromatid-bound protein. Nuclear DNA was detected by mounting slides in Prolong[®] Gold antifade reagent supplemented with DAPI (Invitrogen). Cell images were acquired with a 3-D deconvolution imaging system consisting of a Leica DM RXA microscope equipped with a piezoelectric translator (PIFOC; PI) placed at the base of a 63 \times PlanApo N.A. 1.4 objective, and a CoolSNAP HQ interline CCD camera (Photometrics). Stacks of conventional fluorescence images were collected automatically at a Z-distance of 0.2 μ m (Metamorph software; Molecular Devices). Images are presented as maximum intensity projections generated with ImageJ software, from stacks deconvolved with an extension of Metamorph software [28].

FISH Analysis

FISH was performed with the CEP-8 probe (CEN-8) from Abbott Vysis according to the manufacturer's instructions with

fixation of cells in paraformaldehyde. Images were acquired on a Leica SP5 confocal system, equipped with an argon laser, with 405 nm and 561 nm laser diodes, using a 63 \times /1.4 objective. All recordings were made with the appropriate sampling frequency (512 \times 512 images, line average of 8 and zooming set to 8, pixel size: 60.2 nm). Image processing and quantification were carried out with the freely available Image J software [29]. FISH signal volume was determined with the 3D object counter plugin to Image J software [30]. A binary 3D image was generated, and a tagged map of all objects was obtained, based on pixel connectivity (one tag per independent FISH signal, 26-neighbor connectivity). The number of voxels (i.e. 3D pixels) carrying each tag was retrieved, then multiplied by the unit volume of the voxel (64.5 nm \times 64.5 nm \times 200 nm), to obtain the volume of each object. More information is available from the documentation supplied for the plugin: (http://imagejdocu.tudor.lu/lib/exe/fetch.php?media=plugin:analysis:3d_object_counter:3d-oc.pdf).

Chromosome Spreading and Immunolabeling

Cells were left untreated or were transfected as indicated. After 48 h of transfection with an siRNA specific for Rad21, cells were transferred to slides in 6-well plates. After 24h at 37°C, colchicine was added to a final concentration of 0.1 μ g/ml and the cells were incubated for 1 hour. The cells were then incubated in hypotonic solution (1:5 (vol/vol) FCS-distilled water) and fixed by incubation with a 3:1 (vol/vol) mixture of methanol and acetic acid. Cells were then stained by incubation with 2% Giemsa solution (VWR) for 16 minutes, rinsed in distilled water, dried, and mounted. Chromosomes were observed with a Leica DMRB microscope at 100 \times magnification. Metaphases were captured with a SONY

DXC 930 P camera. Centromeric disjunction classification was evaluated by retrieving intensity profiles with the “plot profile function” of ImageJ applied to distance-calibrated images, along a line placed over the primary constriction region. For chromosome immunolabeling, chromosome spreads were obtained by cytocentrifugation and processed as previously described [27].

Topo II ChIP Analysis

Cells (10^6) were treated with 0.5 mM etoposide for 15 min. They were then lysed in 1.5 ml of buffer containing 1% Sarkosyl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA, and protease inhibitor mixture (Complete Mini, Roche) by 10 passages through a 21G needle. CsCl was added from a concentrated stock solution (7 M), to give a final concentration of 0.5 M. DNA was fragmented by sonicating lysates with a Bioruptor sonicator (Diagenode), with 20-second pulses (20 seconds on/20 seconds off), for 15 minutes at the high-power setting. Under these conditions, DNA fragments of 0.5 to 3 kb were generated, as shown by agarose gel electrophoresis. Before immunoprecipitation (IP), we added 3 volumes of a buffer containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, and protease inhibitor mixture to 1 volume of lysate. The resulting mixture was then centrifuged for 15 min at $16\,000 \times g$ at 4°C. Preclearing was then achieved by adding 60 μ l of Protein G plus agarose beads (Santa Cruz) and rotating the tubes for 2 h at 4°C. The unbound fraction recovered by centrifugation was used for IP reactions. It was incubated overnight, at 4°C, with gentle shaking, with 5 μ g of specific anti-Topo II antibody (KiS1) or control antibody (mouse IgG). Protein G plus agarose beads (Santa Cruz) were added and the mixture was incubated for 1 h. The beads were collected by centrifugation and washed three times with 150 mM NaCl buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, protease inhibitor). Three rounds of elution were then carried out with 500 mM NaCl buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 500 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, protease inhibitor), with the beads collected by centrifugation between elutions. The DNA fragments bound to the beads were treated with 50 μ g/ml RNase A, at 55°C, for 30 min, then with 200 μ g/ml proteinase K at 55°C overnight. They were then purified with the MiniElute PCR Purification kit (QIAGEN), according to the manufacturers' instructions. DNA fragments were quantified with the Quant-IT Pico Green dsDNA kit (Invitrogen™, Molecular Probes®), according to the manufacturer's protocol. Alpha-satellite DNA (20 pg) from chromosome X or chromosome 17 (DXZ1 and D17Z1, respectively) [31] or from pericentromeric DNA satellite 3 [32] was amplified by semiquantitative PCR. PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis and quantified with Image J (NIH) software. The signal obtained from the GFP-BLM cells was taken as 1.

Electron Microscopy

BS and GFP-BLM cells grown at low density on coverslips were fixed by incubation with 2% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer for 24 h and postfixed by incubation with 1% (wt/vol) OsO₄ supplemented with 1.5% (wt/vol) ferrocyanide. They were then dehydrated in ethanol and embedded in Epon. Ultrathin sections were prepared with a Reichert UltracutS ultramicrotome (Leica) and viewed with a TEM CM120 Philips electron microscope after counterstaining with uranyl acetate and lead citrate.

Statistical Methods

Significance was assessed with Student's *t*-test. For all tests, $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Supporting Information

Table S1 Sequences of the siRNAs used in this study. (XLS)

Figure S1 GFP-BLM localizes to the PML body. Colocalization of GFP-BLM (green) with PML (red). Nuclei were visualized by DAPI staining (blue). Scale bar = 5 μ m. (TIF)

Figure S2 Kinetochores structure is not profoundly affected in BLM-deficient cells. CENP-A immunostaining of BS and GFP-BLM metaphase cells revealed a similar localization in the two types of cells. Chromosomes are visualized by DAPI staining (red). Scale bar = 5 μ m. Similar results were obtained with 5 representative kinetochore/centromere proteins (AURORA B, CENP-I, HEC, BUB1 and BUBR1). (TIF)

Figure S3 Structural defects at the centromeres in BLM- and PICH-deficient HeLa cells. Comparison of the volume of the centromeric FISH signal detected on chromosomes 8 from HeLaV-siCtrl (defined as 1), HeLa V-siPICH, HeLash-siBLM and HeLash-siBLM-siPICH cells (right panel). We analyzed between 18 and 27 metaphase cells from two independent experiments for each cell line. BLM and PICH protein levels were assessed by immunoblotting, probing the same membrane with anti-BLM (ab-476) and anti-PICH antibodies and with anti- β actin antibody, as a loading control (upper left panel). (TIF)

Figure S4 BLM-downregulated and PICH-downregulated HeLa cells display non disjunction of centromeres. HeLa cells were transfected for 72 hours with Rad21 siRNAs and transfected with control siRNAs, BLM siRNAs or PICH siRNAs. BLM, PICH and Rad21 protein levels were assessed by immunoblotting, probing the same membrane with anti-BLM (ab-476), anti-PICH and anti-Rad21 antibodies and with anti- β actin antibody, as a loading control (left panel). Chromosome spreads were performed and sorted on the basis of their phenotype: X-shapes, incomplete disjunction or complete disjunction. We analyzed 500 spreads from two independent experiments for each cell line. The frequency of each phenotype, in each of the three cell lines, is shown in the histogram (right panel). Bars represent SD. (TIF)

Figure S5 siRNA-mediated Rad21 downregulation was similarly effective in all conditions. GFP-BLM or HeLa cells were transfected for 72 hours with the indicated siRNAs. Rad21 mRNA levels were determined by reverse transcription quantitative PCR in all conditions. Histograms represent the amplification of Rad21 mRNA from one experiment in triplicate for GFP-BLM and BS cells and are the mean of the amplification of Rad21 mRNA in triplicate in two independent experiments for HeLa cells. Bars represent s.e.m. (TIF)

Figure S6 Centromeric UFBs are not detectable in PICH-deficient cells. (A) (Upper panels) GFP-BLM cells were transfected for 72 hours with PICH or control siRNAs. UFBs were detected by immunostaining of BLM and PICH and quantified (164 UFBs from 129 siCtrl cells and 21 UFBs from 129 siPICH cells were scored in three independent experiments, respectively). Bars represent SDs. (Lower panel) Representative example of a UFB in anaphase cells revealed by BLM staining. The nucleus was visualized by DAPI staining (blue). Scale bar = 5 μ m. (B) Total number of UFBs detected and scored in PICH-downregulated

BLM and PICH in Centromere Disjunction

cells. UFBs positive for PICH only or for BLM only or for both PICH and BLM were scored in three independent experiments including a total of 129 cells transfected with control siRNAs and 129 cells transfected with PICH siRNAs. (TIF)

Acknowledgments

We thank L. Aragon for invaluable discussions, A. Carreira, S. Lambert and O. Gavet for helpful discussions and useful comments on the

manuscript, S. Augui and O. Philipot for advice concerning FISH and ChIP and T. Verly for graphical support.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SR MAG. Performed the experiments: SR GBL IH ROD SG LMJ. Analyzed the data: SR FPC CJ MAG. Wrote the paper: SR MAG.

References

- Carroll CW, Straight AF (2006) Centromere formation: from epigenetics to self-assembly. *Trends Cell Biol* 16: 70–78.
- Cleveland DW, Mao Y, Sullivan KF (2003) Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell* 112: 407–421.
- Yuen KW, Montpetit B, Hieter P (2005) The kinetochore and cancer: what's the connection? *Curr Opin Cell Biol* 17: 576–582.
- Baumann C, Korner R, Hofmann K, Nigg EA (2007) PICH, a centromere-associated SNF2 family ATPase, is regulated by Plk1 and required for the spindle checkpoint. *Cell* 128: 101–114.
- Chan KL, North PS, Hickson ID (2007) BLM is required for faithful chromosome segregation and its localization defines a class of ultrafine anaphase bridges. *EMBO J* 26: 3397–3409.
- Wang LH, Schwarzbraun T, Speicher MR, Nigg EA (2008) Persistence of DNA threads in human anaphase cells suggests late completion of sister chromatid decatenation. *Chromosoma* 117: 123–135.
- Wang LH, Mayer B, Stemmann O, Nigg EA (2010) Centromere DNA decatenation depends on cohesin removal and is required for mammalian cell division. *J Cell Sci* 123: 806–813.
- Amor-Gueret M (2006) Bloom syndrome, genomic instability and cancer: the SOS-like hypothesis. *Cancer Lett* 236: 1–12.
- Ke Y, Huh JW, Warrington R, Li B, Wu N, et al. (2011) PICH and BLM limit histone association with anaphase centromeric DNA threads and promote their resolution. *EMBO J* 30: 3309–3321.
- Chabosseau P, Buhagiar-Labarchede G, Onclercq-Delic R, Lambert S, Debatisse M, et al. (2011) Pyrimidine pool imbalance induced by BLM helicase deficiency contributes to genetic instability in Bloom syndrome. *Nat Commun* 2: 368.
- Yankiwski V, Marciniak RA, Guarente L, Neff NF (2000) Nuclear structure in normal and Bloom syndrome cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5214–5219.
- Pines J, Hunter T (1991) Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. *J Cell Biol* 115: 1–17.
- Guo RB, Rigolet P, Ren H, Zhang B, Zhang XD, et al. (2007) Structural and functional analyses of disease-causing missense mutations in Bloom syndrome protein. *Nucleic Acids Res* 35: 6297–6310.
- Batram C, Baddeley D, Kretsch G, Cremer C (2008) High precision size measurement of centromere 8 and the 8q24/c-myc gene region in metaphase and interphase human fibroblasts indicate differential condensation. *J Struct Biol* 164: 293–303.
- Ke Y, Huh JW, Warrington R, Li B, Wu N, et al. (2011) PICH and BLM limit histone association with anaphase centromeric DNA threads and promote their resolution. *EMBO J* 30: 3309–3021.
- Diaz-Martinez LA, Gimenez-Abian JF, Clarke DJ (2008) Chromosome cohesion - rings, knots, orcs and fellowship. *J Cell Sci* 121: 2107–2114.
- Chan KL, Hickson ID (2011) New insights into the formation and resolution of ultra-fine anaphase bridges. *Semin Cell Dev Biol* 22: 906–912.
- Sano K, Miyaji-Yamaguchi M, Tsutsui KM, Tsutsui K (2008) Topoisomerase II β activates a subset of neuronal genes that are repressed in AT-rich genomic environment. *PLoS One* 3: e4103.
- Baxter J, Sen N, Martinez VL, De Carandini ME, Schwartzman JB, et al. (2011) Positive supercoiling of mitotic DNA drives decatenation by topoisomerase II in eukaryotes. *Science* 331: 1328–1332.
- Eladad S, Ye TZ, Hu P, Leversha M, Beresten S, et al. (2005) Intra-nuclear trafficking of the BLM helicase to DNA damage-induced foci is regulated by SUMO modification. *Hum Mol Genet* 14: 1351–1365.
- Lahkim Bennani-Belhaj K, Rouzeau S, Buhagiar-Labarchede G, Chabosseau P, Onclercq-Delic R, et al. (2010) The Bloom syndrome protein limits the lethality associated with RAD51 deficiency. *Mol Cancer Res* 8: 385–394.
- Hubner NC, Wang LH, Kaulich M, Descombes P, Poser I, et al. (2010) Re-examination of siRNA specificity questions role of PICH and Tao1 in the spindle checkpoint and identifies Mad2 as a sensitive target for small RNAs. *Chromosoma* 119: 149–165.
- Ababou M, Dumaire V, Lecluse Y, Amor-Gueret M (2002) Cleavage of BLM and sensitivity of Bloom's syndrome cells to hydroxyurea and UV-C radiation. *Cell Cycle* 1: 262–266.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, et al. (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55: 611–622.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, et al. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: RESEARCH0034.
- Viegas MH, Gehring NH, Breit S, Hentze MW, Kulozik AE (2007) The abundance of RNPS1, a protein component of the exon junction complex, can determine the variability in efficiency of the Nonsense Mediated Decay pathway. *Nucleic Acids Res* 35: 4542–4551.
- Eot-Houllier G, Fulcrand G, Watanabe Y, Magnaghi-Jaulin L, Jaulin C (2008) Histone deacetylase 3 is required for centromeric H3K4 deacetylation and sister chromatid cohesion. *Genes Dev* 22: 2639–2644.
- Savino TM, Gebrane-Younes J, De Mey J, Sibarita JB, Hernandez-Verdun D (2001) Nucleolar assembly of the rRNA processing machinery in living cells. *J Cell Biol* 153: 1097–1110.
- Agostinho M, Rino J, Braga J, Ferreira F, Steffensen S, et al. (2004) Human topoisomerase II α : targeting to subchromosomal sites of activity during interphase and mitosis. *Mol Biol Cell* 15: 2388–2400.
- Bolte S, Cordelières FP (2006) A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* 224: 213–232.
- Warburton PE, Greig GM, Haaf T, Willard HF (1991) PCR amplification of chromosome-specific alpha satellite DNA: definition of centromeric STS markers and polymorphic analysis. *Genomics* 11: 324–333.
- Jolly C, Metz A, Govin J, Vigneron M, Turner BM, et al. (2004) Stress-induced transcription of satellite III repeats. *J Cell Biol* 164: 25–33.

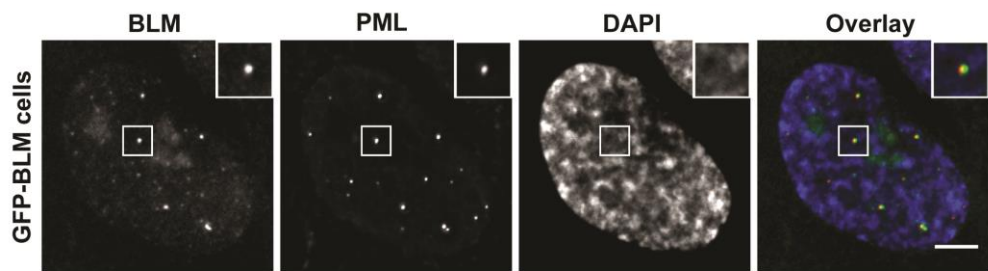


Figure S1

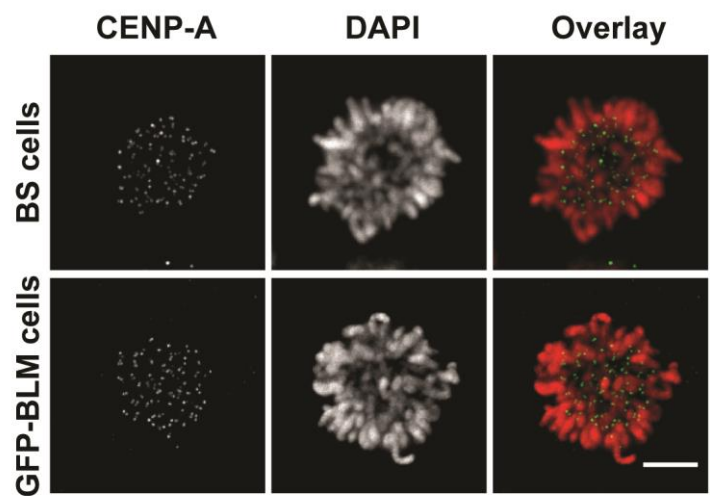


Figure S2

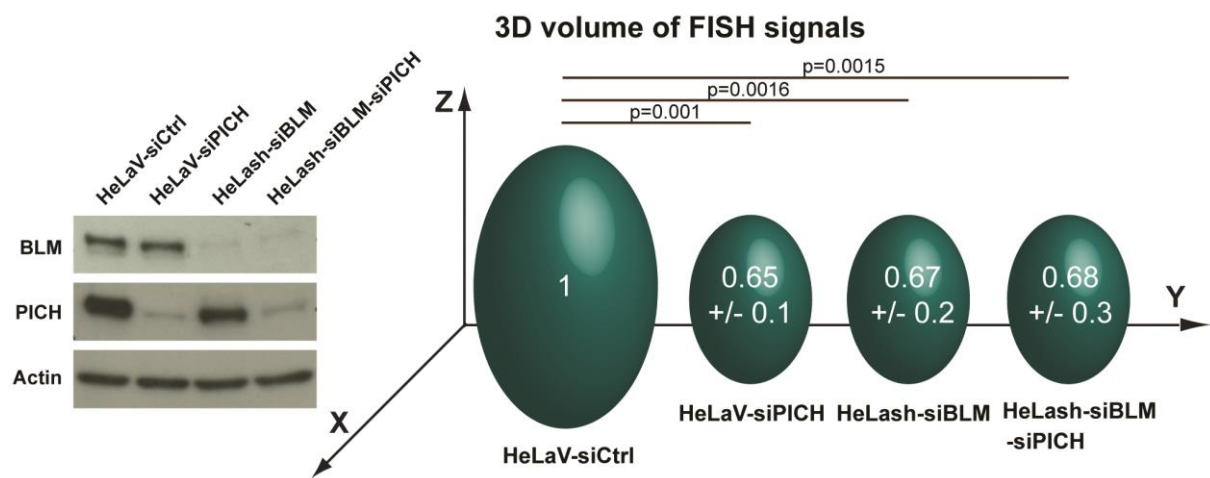


Figure S3

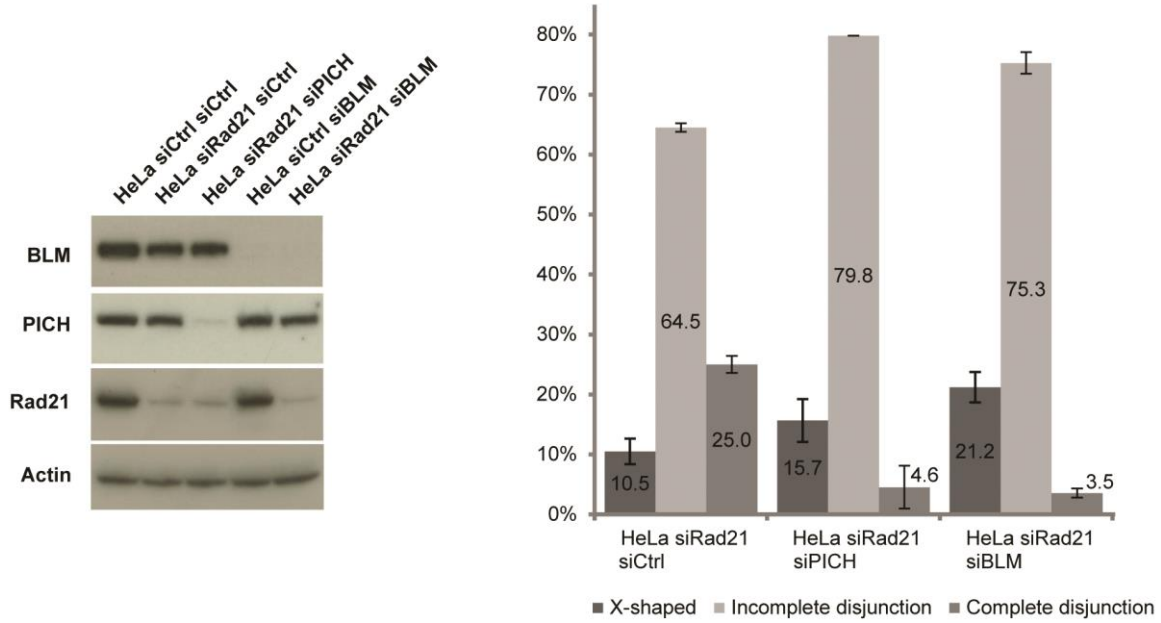


Figure S4

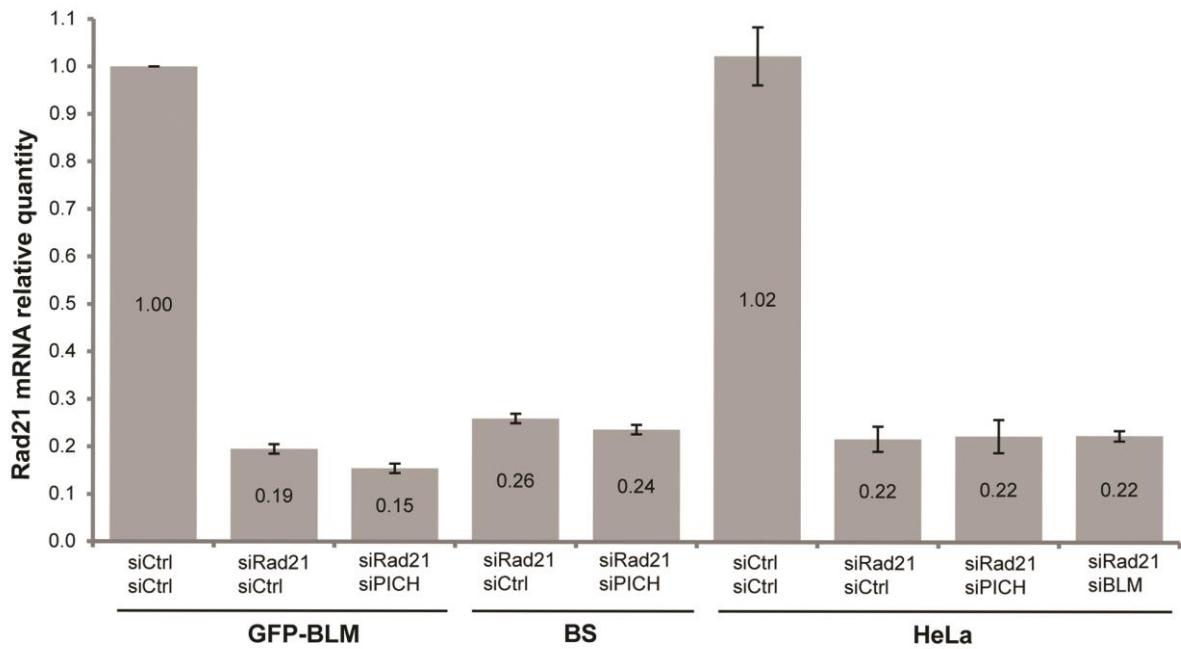


Figure S5

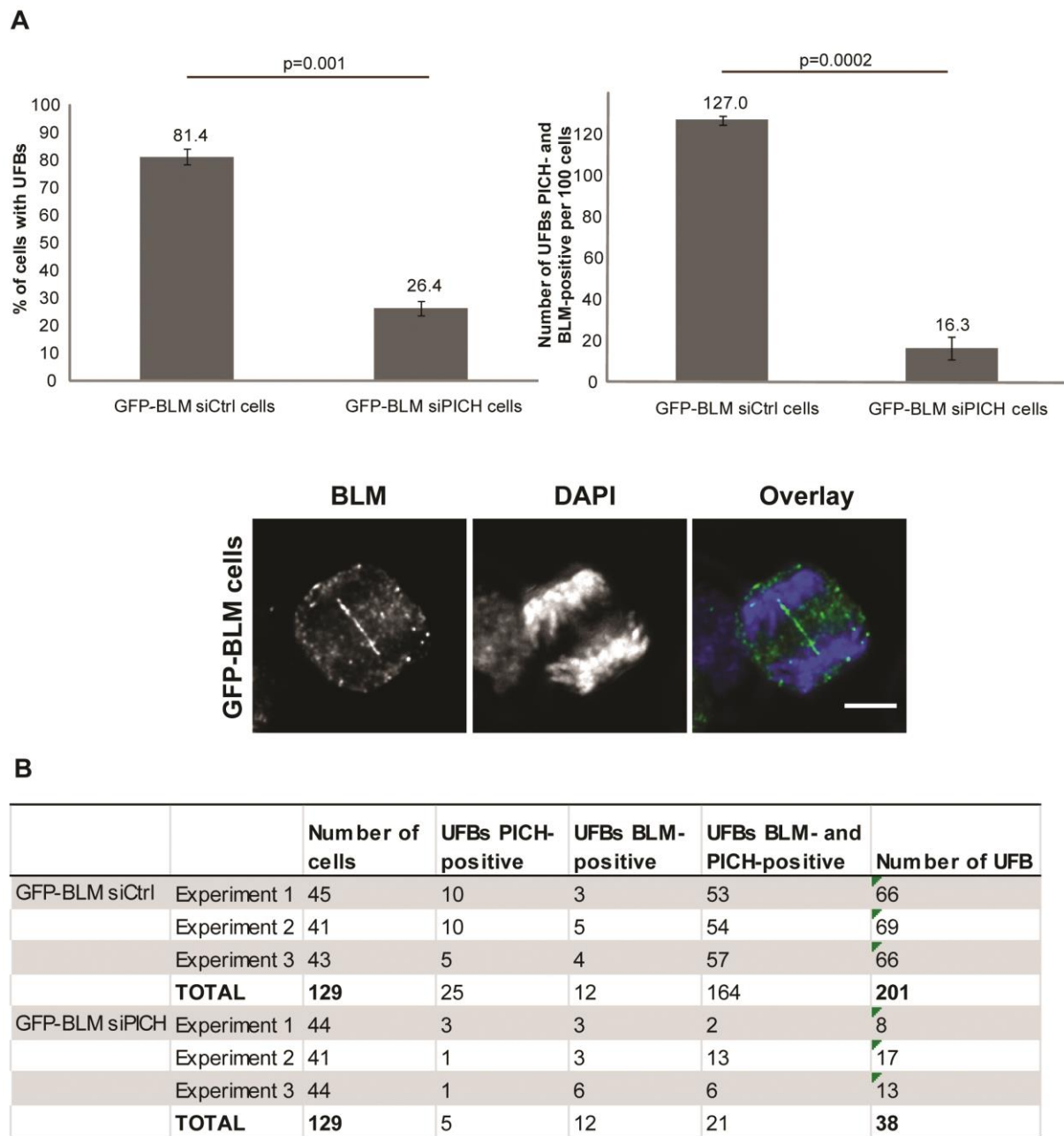


Figure S6

**Listes de mes autres articles
scientifiques sans lien direct avec mon
sujet de thèse et résumés associés**

Cdk5 promotes DNA replication stress checkpoint activation through RPA-32 phosphorylation, and impacts on metastasis free survival in breast cancer patients.



Chiker S¹, Pennaneach V, Loew D, Dingli F, Biard D, Cordelières FP, **Gemble S**, Vacher S, Bieche I, Hall J, Fernet M.

Cell Cycle. 2015 Aug 3:0. [Epub ahead of print]

Author information :

1. Institut Curie, Centre de Recherche, Bât. 110-112, Centre Universitaire, F-91405 Orsay Cedex, France.

Résumé :

Cyclin dependent kinase 5 (Cdk5) is a determinant of PARP inhibitor and ionizing radiation (IR) sensitivity. Here we show that Cdk5-depleted (Cdk5-shRNA) HeLa cells show higher sensitivity to S-phase irradiation, chronic hydroxyurea exposure, and 5-fluorouracil and 6-thioguanine treatment, with hydroxyurea and IR sensitivity also seen in Cdk5-depleted U2OS cells. As Cdk5 is not directly implicated in DNA strand break repair we investigated in detail its proposed role in the intra-S checkpoint activation. Whilst Cdk5-shRNA HeLa cells showed altered basal S-phase dynamics with slower replication velocity and fewer active origins per DNA megabase, checkpoint activation was impaired after a hydroxyurea block. Cdk5 depletion was associated with reduced priming phosphorylations of RPA32 serines 29 and 33 and SMC1-Serine 966 phosphorylation, lower levels of RPA serine 4 and 8 phosphorylation and DNA damage measured using the alkaline Comet assay, gamma-H2AX signal intensity, RPA and Rad51 foci, and sister chromatid exchanges resulting in impaired intra-S checkpoint activation and subsequently higher numbers of chromatin bridges. In vitro kinase assays coupled with mass spectrometry demonstrated the Cdk5 can carry out the RPA32 priming phosphorylations on serines 23, 29, and 33 necessary for this checkpoint activation. In addition we found an association between lower Cdk5 levels and with longer metastasis free survival in breast cancer patients and survival in Cdk5-depleted breast tumor cells after treatment with IR and a PARP inhibitor. Taken together, these results show that Cdk5 is necessary for basal replication and replication stress checkpoint activation and highlight clinical opportunities to enhance tumor cell killing.

clAP1 regulates TNF-mediated cdc42 activation and filopodia formation.



Oncogene

Marivin A¹, Berthelet J¹, Cartier J¹, Paul C², **Gemble S¹**, Morizot A³, Boireau W⁴, Saleh M³, Bertoglio J⁵, Solary E⁶, Dubrez L¹.

Oncogene. 2014 Nov 27;33(48):5534-45. doi: 10.1038/onc.2013.499. Epub 2013 Nov 25.

Author information :

1. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) UMR866, Faculty of Medicine, Dijon, France [2] Université de Bourgogne; Institut Fédératif de Recherche (IFR) 100, Dijon, France.
2. Université de Bourgogne; Institut Fédératif de Recherche (IFR) 100, Dijon, France [2] Ecole Pratique des hautes études (EPHE), Dijon, France.
3. Department of Medicine, McGill University, Montreal, Quebec, Canada.
4. Institut FEMTO-ST, Université de Franche-Comté, CLIPP, Besançon, France.
5. Inserm UMR749, Institut Fédératif de Recherche (IFR) 54, Villejuif, France [2] Institut Gustave Roussy, Institut Fédératif de Recherche (IFR) 54, Villejuif, France.
6. Institut Gustave Roussy, Institut Fédératif de Recherche (IFR) 54, Villejuif, France [2] UMR1009, Institut Fédératif de Recherche (IFR) 54, Villejuif, France.

Résumé :

Tumour necrosis factor- α (TNF) is a cytokine endowed with multiple functions, depending on the cellular and environmental context. TNF receptor engagement induces the formation of a multimolecular complex including the TNFR-associated factor TRAF2, the receptor-interaction protein kinase RIP1 and the cellular inhibitor of apoptosis cIAP1, the latter being essential for NF- κ B activation. Here, we show that cIAP1 also regulates TNF-induced actin cytoskeleton reorganization through a cdc42-dependent, NF- κ B-independent pathway. Deletion of cIAP1 prevents TNF-induced filopodia and cdc42 activation. The expression of cIAP1 or its E3-ubiquitin ligase-defective mutant restores the ability of cIAP1(-/-) MEFs to produce filopodia, whereas a cIAP1 mutant unable to bind TRAF2 does not. Accordingly, the silencing of TRAF2 inhibits TNF-mediated filopodia formation, whereas silencing of RIP1 does not. cIAP1 directly binds cdc42 and promotes its RhoGDI α -mediated stabilization. TNF decreases cIAP1-cdc42 interaction, suggesting that TNF-induced recruitment of cIAP1/TRAF2 to the receptor releases cdc42, which in turn triggers actin remodeling. cIAP1 also regulates cdc42 activation in response to EGF and HRas-V12 expression. A downregulation of cIAP1 altered the cell polarization, the cell adhesion to endothelial cells and cell intercalation, which are cdc42-dependent processes. Finally, we demonstrated that the deletion of cIAP1 regulated the HRas-V12-mediated transformation process, including anchorage-dependent cell growth, tumour growth in a xenograft model and the development of experimental metastasis in the lung.

Cellular inhibitor of apoptosis protein-1 (cIAP1) can regulate E2F1 transcription factor-mediated control of cyclin transcription.



Cartier J¹, Berthelet J, Marivin A, **Gemble S**, Edmond V, Plenchette S, Lagrange B, Hammann A, Dupoux A, Delva L, Eymin B, Solary E, Dubrez L.

J Biol Chem. 2011 Jul 29;286(30):26406-17. doi: 10.1074/jbc.M110.191239. Epub 2011 Jun 8.

Author information :

1. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale UMR866, Dijon, F-21079, France.

Résumé :

The inhibitor of apoptosis protein cIAP1 (cellular inhibitor of apoptosis protein-1) is a potent regulator of the tumor necrosis factor (TNF) receptor family and NF- κ B signaling pathways in the cytoplasm. However, in some primary cells and tumor cell lines, cIAP1 is expressed in the nucleus, and its nuclear function remains poorly understood. Here, we show that the N-terminal part of cIAP1 directly interacts with the DNA binding domain of the E2F1 transcription factor. cIAP1 dramatically increases the transcriptional activity of E2F1 on synthetic and CCNE promoters. This function is not conserved for cIAP2 and XIAP, which are cytoplasmic proteins. Chromatin immunoprecipitation experiments demonstrate that cIAP1 is recruited on E2F binding sites of the CCNE and CCNA promoters in a cell cycle- and differentiation-dependent manner. cIAP1 silencing inhibits E2F1 DNA binding and E2F1-mediated transcriptional activation of the CCNE gene. In cells that express a nuclear cIAP1 such as HeLa, THP1 cells and primary human mammary epithelial cells, down-regulation of cIAP1 inhibits cyclin E and A expression and cell proliferation. We conclude that one of the functions of cIAP1 when localized in the nucleus is to regulate E2F1 transcriptional activity.

BIBLIOGRAPHIE

- Aarts, M. *et al.* Forced mitotic entry of S-phase cells as a therapeutic strategy induced by inhibition of WEE1. *Cancer Discov* **2**, 524–539 (2012).
- Ababou, M. *et al.* ATM-dependent phosphorylation and accumulation of endogenous BLM protein in response to ionizing radiation. *Oncogene* **19**, 5955–5963 (2000).
- Ababou, M., Dumaire, V., Lécluse, Y. & Amor-Guérét, M. Bloom's syndrome protein response to ultraviolet-C radiation and hydroxyurea-mediated DNA synthesis inhibition. *Oncogene* **21**, 2079–2088 (2002).
- Abraham, A. *et al.* Cytidine deaminase genetic variants influence RNA expression and cytarabine cytotoxicity in acute myeloid leukemia. *Pharmacogenomics* **13**, 269–282 (2012).
- Achanta, G., Pelicano, H., Feng, L., Plunkett, W. & Huang, P. Interaction of p53 and DNA-PK in response to nucleoside analogues: potential role as a sensor complex for DNA damage. *Cancer Res.* **61**, 8723–8729 (2001).
- Acilan, C., Potter, D. M. & Saunders, W. S. DNA repair pathways involved in anaphase bridge formation. *Genes Chromosomes Cancer* **46**, 522–531 (2007).
- Adams, M. D., McVey, M. & Sekelsky, J. J. Drosophila BLM in double-strand break repair by synthesis-dependent strand annealing. *Science* **299**, 265–267 (2003).
- Aggarwal, M., Sommers, J. A., Morris, C. & Brosh, R. M. Delineation of WRN helicase function with EXO1 in the replicational stress response. *DNA Repair (Amst.)* **9**, 765–776 (2010).
- Ahel, D. *et al.* Poly(ADP-ribose)-dependent regulation of DNA repair by the chromatin remodeling enzyme ALC1. *Science* **325**, 1240–1243 (2009).
- Ahel, I. *et al.* Poly(ADP-ribose)-binding zinc finger motifs in DNA repair/checkpoint proteins. *Nature* **451**, 81–85 (2008).
- Ahlander, J. & Bosco, G. The RB/E2F pathway and regulation of RNA processing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **384**, 280–283 (2009).
- Ahluwalia, D., Bienstock, R. J. & Schaaper, R. M. Novel mutator mutants of *E. Coli* nrdAB ribonucleotide reductase: insight into allosteric regulation and control of mutation rates. *DNA Repair (Amst.)* **11**, 480–487 (2012).
- Altmeyer, M., Messner, S., Hassa, P. O., Fey, M. & Hottiger, M. O. Molecular mechanism of poly(ADP-ribosyl)ation by PARP1 and identification of lysine residues as ADP-ribose acceptor sites. *Nucleic Acids Res.* **37**, 3723–3738 (2009).
- Amé, J. C. *et al.* PARP-2, A novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase. *J. Biol. Chem.* **274**, 17860–17868 (1999).
- Amé, J.-C., Spenlehauer, C. & de Murcia, G. The PARP superfamily. *Bioessays* **26**, 882–893 (2004).
- Amor-Guérét, M. Bloom syndrome, genomic instability and cancer: the SOS-like hypothesis. *Cancer Lett.* **236**, 1–12 (2006).
- Amor-Guérét, M. *et al.* Three new BLM gene mutations associated with Bloom syndrome. *Genet. Test.* **12**, 257–261 (2008).
- Amours, D. D', Desnoyers, S., Silva, I. D' & Poirier, G. G. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem. J.* **342 (Pt 2)**, 249–268 (1999).
- An, S., Kumar, R., Sheets, E. D. & Benkovic, S. J. Reversible compartmentalization of de novo purine biosynthetic complexes in living cells. *Science* **320**, 103–106 (2008).
- An, S., Kyoung, M., Allen, J. J., Shokat, K. M. & Benkovic, S. J. Dynamic regulation of a metabolic multi-enzyme complex by protein kinase CK2. *J. Biol. Chem.* **285**, 11093–11099 (2010).
- Anders, C. K. *et al.* Poly(ADP-Ribose) polymerase inhibition: 'targeted' therapy for triple-negative breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **16**, 4702–4710 (2010).
- Araki, T., Sasaki, Y. & Milbrandt, J. Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science* **305**, 1010–1013 (2004).
- Aravind, L. The WWE domain: a common interaction module in protein ubiquitination and ADP ribosylation. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 273–275 (2001).
- Arecco, A., Mun, B. J. & Mathews, C. K. Deoxyribonucleotide pools as targets for mutagenesis by N-methyl-N-nitrosourea. *Mutat. Res.* **200**, 165–175 (1988).
- Ariyoshi, K., Suzuki, K., Goto, M., Watanabe, M. & Kodama, S. Increased chromosome instability and accumulation of DNA double-strand breaks in Werner syndrome cells. *J. Radiat. Res.* **48**, 219–231 (2007).
- Arlt, M. F. & Glover, T. W. Inhibition of topoisomerase I prevents chromosome breakage at common fragile sites. *DNA Repair (Amst.)* **9**, 678–689 (2010).
- Arora, H. *et al.* Bloom syndrome. *Int. J. Dermatol.* **53**, 798–802 (2014).

- Arpaia, E. et al. Biochemical and immunological abnormalities in purine nucleoside phosphorylase deficient mice. *Adv. Exp. Med. Biol.* **486**, 41–45 (2000).
- Atasheva, S., Akhrymuk, M., Frolova, E. I. & Frolov, I. New PARP gene with an anti-alphavirus function. *J. Virol.* **86**, 8147–8160 (2012).
- Audebert, M., Salles, B. & Calsou, P. Effect of double-strand break DNA sequence on the PARP-1 NHEJ pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **369**, 982–988 (2008).
- Aze, A., Zhou, J. C., Costa, A. & Costanzo, V. DNA replication and homologous recombination factors: acting together to maintain genome stability. *Chromosoma* **122**, 401–413 (2013).
- Bachrati, C. Z. & Hickson, I. D. RecQ helicases: guardian angels of the DNA replication fork. *Chromosoma* **117**, 219–233 (2008).
- Bachrati, C. Z. & Hickson, I. D. RecQ helicases: suppressors of tumorigenesis and premature aging. *Biochem. J.* **374**, 577–606 (2003).
- Bachrati, C. Z., Borts, R. H. & Hickson, I. D. Mobile D-loops are a preferred substrate for the Bloom's syndrome helicase. *Nucleic Acids Res.* **34**, 2269–2279 (2006).
- Baharoglu, Z. & Mazel, D. SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**, 1126–1145 (2014).
- Bai, P. & Cantó, C. The role of PARP-1 and PARP-2 enzymes in metabolic regulation and disease. *Cell Metab.* **16**, 290–295 (2012).
- Bai, P. Biology of Poly(ADP-Ribose) Polymerases: The Factotums of Cell Maintenance. *Mol. Cell* **58**, 947–958 (2015).
- Bai, P. et al. PARP-2 regulates SIRT1 expression and whole-body energy expenditure. *Cell Metab.* **13**, 450–460 (2011).
- Bai, P. et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-2 [corrected] controls adipocyte differentiation and adipose tissue function through the regulation of the activity of the retinoid X receptor/peroxisome proliferator-activated receptor-gamma [corrected] heterodimer. *J. Biol. Chem.* **282**, 37738–37746 (2007).
- Bajrami, I. et al. Synthetic lethality of PARP and NAMPT inhibition in triple-negative breast cancer cells. *EMBO Mol Med* **4**, 1087–1096 (2012).
- Baker, J. A. R. et al. Pharmacogenomics of gemcitabine metabolism: functional analysis of genetic variants in cytidine deaminase and deoxycytidine kinase. *Drug Metab. Dispos.* **41**, 541–545 (2013).
- Baldwin, S. A. et al. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch.* **447**, 735–743 (2004).
- Banerjee, A. & Benedict, W. F. Production of sister chromatid exchanges by various cancer chemotherapeutic agents. *Cancer Res.* **39**, 797–799 (1979).
- Barakat, A. et al. Identification of a novel BLM missense mutation (2706T>C) in a Moroccan patient with Bloom's syndrome. *Hum. Mutat.* **15**, 584–585 (2000).
- Barefield, C. & Karlseder, J. The BLM helicase contributes to telomere maintenance through processing of late-replicating intermediate structures. *Nucleic Acids Res.* **40**, 7358–7367 (2012).
- Baresova, V. et al. Mutations of ATIC and ADSL affect purinosome assembly in cultured skin fibroblasts from patients with AICA-ribosiduria and ADSL deficiency. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 1534–1543 (2012).
- Barkauskaite, E., Jankevicius, G. & Ahel, I. Structures and Mechanisms of Enzymes Employed in the Synthesis and Degradation of PARP-Dependent Protein ADP-Ribosylation. *Mol. Cell* **58**, 935–946 (2015).
- Bartkova, J. et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* **434**, 864–870 (2005).
- Bartos, J. D., Wang, W., Pike, J. E. & Bambara, R. A. Mechanisms by which Bloom protein can disrupt recombination intermediates of Okazaki fragment maturation. *J. Biol. Chem.* **281**, 32227–32239 (2006).
- Baumann, C., Körner, R., Hofmann, K. & Nigg, E. A. PICH, a centromere-associated SNF2 family ATPase, is regulated by Plk1 and required for the spindle checkpoint. *Cell* **128**, 101–114 (2007).
- Baxter, J. 'Breaking up is hard to do': the formation and resolution of sister chromatid intertwines. *J. Mol. Biol.* **427**, 590–607 (2015).
- Bayart, E. et al. The Bloom syndrome helicase is a substrate of the mitotic Cdc2 kinase. *Cell Cycle* **5**, 1681–1686 (2006).
- Bayart, E., Grigorieva, O., Leibovitch, S., Onclercq-Delic, R. & Amor-Guérét, M. A major role for mitotic CDC2 kinase inactivation in the establishment of the mitotic DNA damage checkpoint. *Cancer Res.* **64**, 8954–8959 (2004).

- Baynton, K. *et al.* WRN interacts physically and functionally with the recombination mediator protein RAD52. *J. Biol. Chem.* **278**, 36476–36486 (2003).
- Bebenek, K., Roberts, J. D. & Kunkel, T. A. The effects of dNTP pool imbalances on frameshift fidelity during DNA replication. *J. Biol. Chem.* **267**, 3589–3596 (1992).
- Beck, C., Robert, I., Reina-San-Martin, B., Schreiber, V. & Dantzer, F. Poly(ADP-ribose) polymerases in double-strand break repair: focus on PARP1, PARP2 and PARP3. *Exp. Cell Res.* **329**, 18–25 (2014).
- Becket, E., Tse, L., Yung, M., Cosico, A. & Miller, J. H. Polynucleotide phosphorylase plays an important role in the generation of spontaneous mutations in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **194**, 5613–5620 (2012).
- Bell, C. E. & Eisenberg, D. Crystal structure of diphtheria toxin bound to nicotinamide adenine dinucleotide. *Biochemistry* **35**, 1137–1149 (1996).
- Berger, F., Lau, C. & Ziegler, M. Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase 1 activity by the phosphorylation state of the nuclear NAD biosynthetic enzyme NMN adenylyl transferase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 3765–3770 (2007).
- Berger, F., Ramírez-Hernández, M. H. & Ziegler, M. The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P). *Trends Biochem. Sci.* **29**, 111–118 (2004).
- Bergoglio, V. *et al.* DNA synthesis by Pol η promotes fragile site stability by preventing under-replicated DNA in mitosis. *J. Cell Biol.* **201**, 395–408 (2013).
- Bernstein, D. A. & Keck, J. L. Domain mapping of *Escherichia coli* RecQ defines the roles of conserved N- and C-terminal regions in the RecQ family. *Nucleic Acids Res.* **31**, 2778–2785 (2003).
- Bernstein, D. A., Zittel, M. C. & Keck, J. L. High-resolution structure of the *E. coli* RecQ helicase catalytic core. *EMBO J.* **22**, 4910–4921 (2003).
- Bester, A. C. *et al.* Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stages of cancer development. *Cell* **145**, 435–446 (2011).
- Bétermier, M., Bertrand, P. & Lopez, B. S. Is non-homologous end-joining really an inherently error-prone process? *PLoS Genet.* **10**, e1004086 (2014).
- Bhattacharyya, S. *et al.* Telomerase-associated protein 1, HSP90, and topoisomerase II α associate directly with the BLM helicase in immortalized cells using ALT and modulate its helicase activity using telomeric DNA substrates. *J. Biol. Chem.* **284**, 14966–14977 (2009).
- Bianchi, V. & Spychala, J. Mammalian 5'-nucleotidases. *J. Biol. Chem.* **278**, 46195–46198 (2003).
- Biebricher, A. *et al.* PICH: a DNA translocase specially adapted for processing anaphase bridge DNA. *Mol. Cell* **51**, 691–701 (2013).
- Bischof, O. *et al.* Regulation and localization of the Bloom syndrome protein in response to DNA damage. *J. Cell Biol.* **153**, 367–380 (2001).
- Blackford, A. N. *et al.* TopBP1 interacts with BLM to maintain genome stability but is dispensable for preventing BLM degradation. *Mol. Cell* **57**, 1133–1141 (2015).
- Boehler, C. *et al.* Poly(ADP-ribose) polymerase 3 (PARP3), a newcomer in cellular response to DNA damage and mitotic progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 2783–2788 (2011).
- Böhm, S. & Bernstein, K. A. The role of post-translational modifications in fine-tuning BLM helicase function during DNA repair. *DNA Repair (Amst.)* **22**, 123–132 (2014).
- Bouchard, V. J., Rouleau, M. & Poirier, G. G. PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Exp. Hematol.* **31**, 446–454 (2003).
- Boucher, M. J. *et al.* MEK/ERK signaling pathway regulates the expression of Bcl-2, Bcl-X(L), and Mcl-1 and promotes survival of human pancreatic cancer cells. *J. Cell. Biochem.* **79**, 355–369 (2000).
- Boutros, R., Lobjois, V. & Ducommun, B. CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat. Rev. Cancer* **7**, 495–507 (2007).
- Boyer, A.-S., Grgurevic, S., Cazaux, C. & Hoffmann, J.-S. The human specialized DNA polymerases and non-B DNA: vital relationships to preserve genome integrity. *J. Mol. Biol.* **425**, 4767–4781 (2013).
- Brendel, M. Mutation induction by excess deoxyribonucleotides in *Saccharomyces cerevisiae*. *Basic Life Sci.* **31**, 425–434 (1985).
- Brenner, J. C. *et al.* Mechanistic rationale for inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in ETS gene fusion-positive prostate cancer. *Cancer Cell* **19**, 664–678 (2011).

- Brenner, J. C. *et al.* PARP-1 inhibition as a targeted strategy to treat Ewing's sarcoma. *Cancer Res.* **72**, 1608–1613 (2012).
- Broderick, R., Nieminuszczy, J., Blackford, A. N., Winczura, A. & Niedzwiedz, W. TOPBP1 recruits TOP2A to ultra-fine anaphase bridges to aid in their resolution. *Nat Commun* **6**, 6572 (2015).
- Brookwell, R., Daniel, A., Turner, G. & Fishburn, J. The fragile X(q27) form of X-linked mental retardation: FUDR as an inducing agent for fra(X)(q27) expression in lymphocytes, fibroblasts, and amniocytes. *Am. J. Med. Genet.* **13**, 139–148 (1982).
- Brosh, R. M. *et al.* Functional and physical interaction between WRN helicase and human replication protein A. *J. Biol. Chem.* **274**, 18341–18350 (1999).
- Brosh, R. M. *et al.* Replication protein A physically interacts with the Bloom's syndrome protein and stimulates its helicase activity. *J. Biol. Chem.* **275**, 23500–23508 (2000).
- Brosh, R. M., Opresko, P. L. & Bohr, V. A. Enzymatic mechanism of the WRN helicase/nuclease. *Meth. Enzymol.* **409**, 52–85 (2006).
- Bruny nszki, A. *et al.* Genetic ablation of PARP-1 protects against oxazolone-induced contact hypersensitivity by modulating oxidative stress. *J. Invest. Dermatol.* **130**, 2629–2637 (2010).
- Bryant, H. E. *et al.* PARP is activated at stalled forks to mediate Mre11-dependent replication restart and recombination. *EMBO J.* **28**, 2601–2615 (2009).
- Bryant, H. E. *et al.* Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* **434**, 913–917 (2005).
- Buckstein, M. H., He, J. & Rubin, H. Characterization of nucleotide pools as a function of physiological state in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **190**, 718–726 (2008).
- Bugreev, D. V., Brosh, R. M. & Mazin, A. V. RECQ1 possesses DNA branch migration activity. *J. Biol. Chem.* **283**, 20231–20242 (2008).
- Bugreev, D. V., Mazina, O. M. & Mazin, A. V. Bloom syndrome helicase stimulates RAD51 DNA strand exchange activity through a novel mechanism. *J. Biol. Chem.* **284**, 26349–26359 (2009).
- Bugreev, D. V., Rossi, M. J. & Mazin, A. V. Cooperation of RAD51 and RAD54 in regression of a model replication fork. *Nucleic Acids Res.* **39**, 2153–2164 (2011).
- Bugreev, D. V., Yu, X., Egelman, E. H. & Mazin, A. V. Novel pro- and anti-recombination activities of the Bloom's syndrome helicase. *Genes Dev.* **21**, 3085–3094 (2007).
- Bunting, S. F. *et al.* 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell* **141**, 243–254 (2010).
- Burgess, A., Rasouli, M. & Rogers, S. Stressing mitosis to death. *Front Oncol* **4**, 140 (2014).
- Burkman, R. T. Reproductive hormones and cancer: ovarian and colon cancer. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* **29**, 527–540 (2002).
- Bussen, W., Raynard, S., Busygina, V., Singh, A. K. & Sung, P. Holliday junction processing activity of the BLM-Topo IIIalpha-BLAP75 complex. *J. Biol. Chem.* **282**, 31484–31492 (2007).
- Caldecott, K. W. Protein ADP-ribosylation and the cellular response to DNA strand breaks. *DNA Repair (Amst.)* **19**, 108–113 (2014).
- Calin, G., Herlea, V., Barbanti-Brodano, G. & Negrini, M. The coding region of the Bloom syndrome BLM gene and of the CBL proto-oncogene is mutated in genetically unstable sporadic gastrointestinal tumors. *Cancer Res.* **58**, 3777–3781 (1998).
- Camienner, G. W. Studies of the enzymatic deamination of cytosine arabinoside. 3. Substrate requirements and inhibitors of the deaminase of human liver. *Biochem. Pharmacol.* **16**, 1691–1702 (1967).
- Caronia, D. *et al.* A polymorphism in the cytidine deaminase promoter predicts severe capecitabine-induced hand-foot syndrome. *Clin. Cancer Res.* **17**, 2006–2013 (2011).
- Carr, A. M. & Lambert, S. Replication stress-induced genome instability: the dark side of replication maintenance by homologous recombination. *J. Mol. Biol.* **425**, 4733–4744 (2013).
- Castro, M. *et al.* Thirteen years experience with selective screening for disorders in purine and pyrimidine metabolism. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **33**, 233–240 (2014).
- Chabes, A. *et al.* Survival of DNA damage in yeast directly depends on increased dNTP levels allowed by relaxed feedback inhibition of ribonucleotide reductase. *Cell* **112**, 391–401 (2003).

- Chabes, A. L., Björklund, S. & Thelander, L. S Phase-specific transcription of the mouse ribonucleotide reductase R2 gene requires both a proximal repressive E2F-binding site and an upstream promoter activating region. *J. Biol. Chem.* **279**, 10796–10807 (2004).
- Chabes, A. L., Pfleger, C. M., Kirschner, M. W. & Thelander, L. Mouse ribonucleotide reductase R2 protein: a new target for anaphase-promoting complex-Cdh1-mediated proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 3925–3929 (2003).
- Chabes, A., Domkin, V. & Thelander, L. Yeast Sml1, a protein inhibitor of ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* **274**, 36679–36683 (1999).
- Chabosseau, P. et al. Pyrimidine pool imbalance induced by BLM helicase deficiency contributes to genetic instability in Bloom syndrome. *Nat Commun* **2**, 368 (2011).
- Chabot, G. G., Bouchard, J. & Mompalmer, R. L. Kinetics of deamination of 5-aza-2'-deoxycytidine and cytosine arabinoside by human liver cytidine deaminase and its inhibition by 3-deazauridine, thymidine or uracil arabinoside. *Biochem. Pharmacol.* **32**, 1327–1328 (1983).
- Chaganti, R. S., Schonberg, S. & German, J. A manyfold increase in sister chromatid exchanges in Bloom's syndrome lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **71**, 4508–4512 (1974).
- Chalmers, A., Johnston, P., Woodcock, M., Joiner, M. & Marples, B. PARP-1, PARP-2, and the cellular response to low doses of ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **58**, 410–419 (2004).
- Chambon, P., Weill, J. D. & Mandel, P. Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **11**, 39–43 (1963).
- Chan, K. L. & Hickson, I. D. On the origins of ultra-fine anaphase bridges. *Cell Cycle* **8**, 3065–3066 (2009).
- Chan, K. L., Palmieri-Pallag, T., Ying, S. & Hickson, I. D. Replication stress induces sister-chromatid bridging at fragile site loci in mitosis. *Nat. Cell Biol.* **11**, 753–760 (2009).
- Chan, K.-L., North, P. S. & Hickson, I. D. BLM is required for faithful chromosome segregation and its localization defines a class of ultrafine anaphase bridges. *EMBO J.* **26**, 3397–3409 (2007).
- Chandra, J. et al. Resistance of leukemic cells to 2-chlorodeoxyadenosine is due to a lack of calcium-dependent cytochrome c release. *Blood* **99**, 655–663 (2002).
- Chang, M. et al. RMI1/NCE4, a suppressor of genome instability, encodes a member of the RecQ helicase/Topo III complex. *EMBO J.* **24**, 2024–2033 (2005).
- Chang, P., Coughlin, M. & Mitchison, T. J. Tankyrase-1 polymerization of poly(ADP-ribose) is required for spindle structure and function. *Nat. Cell Biol.* **7**, 1133–1139 (2005).
- Chang, W. J. & Alvarez-Gonzalez, R. The sequence-specific DNA binding of NF-kappa B is reversibly regulated by the automodification reaction of poly (ADP-ribose) polymerase 1. *J. Biol. Chem.* **276**, 47664–47670 (2001).
- Chen, C.-T. & Doxsey, S. A last-minute rescue of trapped chromatin. *Cell* **136**, 397–399 (2009).
- Chen, M.-S., Ryan, C. E. & Piwnicka-Worms, H. Chk1 kinase negatively regulates mitotic function of Cdc25A phosphatase through 14-3-3 binding. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 7488–7497 (2003).
- Cheng, W.-H. et al. WRN is required for ATM activation and the S-phase checkpoint in response to interstrand cross-link-induced DNA double-strand breaks. *Mol. Biol. Cell* **19**, 3923–3933 (2008).
- Cheok, C. F. et al. Roles of the Bloom's syndrome helicase in the maintenance of genome stability. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 1456–1459 (2005).
- Chiker, S. et al. Cdk5 promotes DNA replication stress checkpoint activation through RPA-32 phosphorylation, and impacts on metastasis free survival in breast cancer patients. *Cell Cycle* 00–00 (2015). doi:[10.1080/15384101.2015.1078020](https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1078020)
- Chimploy, K. & Mathews, C. K. Mouse ribonucleotide reductase control: influence of substrate binding upon interactions with allosteric effectors. *J. Biol. Chem.* **276**, 7093–7100 (2001).
- Chiruvella, K. K., Liang, Z. & Wilson, T. E. Repair of double-strand breaks by end joining. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a012757 (2013).
- Cho, S. H. et al. PARP-14, a member of the B aggressive lymphoma family, transduces survival signals in primary B cells. *Blood* **113**, 2416–2425 (2009).
- Choo, K. H. Domain organization at the centromere and neocentromere. *Dev. Cell* **1**, 165–177 (2001).
- Cho-Park, P. F. & Steller, H. Proteasome regulation by ADP-ribosylation. *Cell* **153**, 614–627 (2013).

- Chou, D. M. *et al.* A chromatin localization screen reveals poly (ADP ribose)-regulated recruitment of the repressive polycomb and NuRD complexes to sites of DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**,18475–18480 (2010).
- Chu, W. K. & Hickson, I. D. RecQ helicases: multifunctional genome caretakers. *Nat. Rev. Cancer* **9**,644–654 (2009).
- Ciccia, A. & Elledge, S. J. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol. Cell***40**, 179–204 (2010).
- Ciccolini, J. *et al.* Cytidine deaminase residual activity in serum is a predictive marker of early severe toxicities in adults after gemcitabine-based chemotherapies. *J. Clin. Oncol.* **28**,160–165 (2010).
- Cimprich, K. A. & Cortez, D. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.***9**, 616–627 (2008).
- Ciosk, R. *et al.* An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast. *Cell* **93**, 1067–1076 (1998).
- Citarelli, M., Teotia, S. & Lamb, R. S. Evolutionary history of the poly(ADP-ribose) polymerase gene family in eukaryotes. *BMC Evol. Biol.* **10**, 308 (2010).
- Clarke J (2006). Laboratory investigations and Treatment. In:Clarke J, ed. *A Clinical Guide to Inherited Metabolic Diseases*. Port Chester, NY: Cambridge University Press, 241–321.
- Coelho, P. A., Queiroz-Machado, J. & Sunkel, C. E. Condensin-dependent localisation of topoisomerase II to an axial chromosomal structure is required for sister chromatid resolution during mitosis. *J. Cell. Sci.***116**, 4763–4776 (2003).
- Cohen-Armon, M. *et al.* DNA-independent PARP-1 activation by phosphorylated ERK2 increases Elk1 activity: a link to histone acetylation. *Mol. Cell* **25**, 297–308 (2007).
- Cox, M. M. The bacterial RecA protein as a motor protein. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**,551–577 (2003).
- Croteau, D. L. *et al.* RAPADILINO RECQL4 mutant protein lacks helicase and ATPase activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1822**, 1727–1734 (2012).
- Croteau, D. L., Popuri, V., Opresko, P. L. & Bohr, V. A. Human RecQ helicases in DNA repair, recombination, and replication. *Annu. Rev. Biochem.* **83**,519–552 (2014).
- Cui, S. *et al.* Characterization of the DNA-unwinding activity of human RECQ1, a helicase specifically stimulated by human replication protein A. *J. Biol. Chem.* **278**,1424–1432 (2003).
- Cupples, C. G. & Miller, J. H. A set of lacZ mutations in Escherichia coli that allow rapid detection of each of the six base substitutions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 5345–5349 (1989).
- Daniels, C. M., Ong, S.-E. & Leung, A. K. L. The Promise of Proteomics for the Study of ADP-Ribosylation. *Mol. Cell* **58**, 911–924 (2015).
- Dantzer, F. *et al.* Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry* **39**,7559–7569 (2000).
- Dantzer, F. *et al.* Functional interaction between poly(ADP-Ribose) polymerase 2 (PARP-2) and TRF2: PARP activity negatively regulates TRF2. *Mol. Cell. Biol.* **24**,1595–1607 (2004).
- Dantzer, F. *et al.* Poly(ADP-ribose) polymerase-2 contributes to the fidelity of male meiosis I and spermiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**,14854–14859 (2006).
- Davalos, A. R. & Campisi, J. Bloom syndrome cells undergo p53-dependent apoptosis and delayed assembly of BRCA1 and NBS1 repair complexes at stalled replication forks. *J. Cell Biol.***162**, 1197–1209 (2003).
- Davalos, A. R., Kaminker, P., Hansen, R. K. & Campisi, J. ATR and ATM-dependent movement of BLM helicase during replication stress ensures optimal ATM activation and 53BP1 focus formation. *Cell Cycle* **3**, 1579–1586 (2004).
- Davies, K. D. *et al.* Chk1 inhibition and Wee1 inhibition combine synergistically to impede cellular proliferation. *Cancer Biol. Ther.***12**, 788–796 (2011).
- Davies, S. L., North, P. S. & Hickson, I. D. Role for BLM in replication-fork restart and suppression of origin firing after replicative stress. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 677–679 (2007).
- Davies, S. L., North, P. S., Dart, A., Lakin, N. D. & Hickson, I. D. Phosphorylation of the Bloom's syndrome helicase and its role in recovery from S-phase arrest. *Mol. Cell. Biol.* **24**,1279–1291 (2004).
- De Lange, T. T-loops and the origin of telomeres. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.***5**, 323–329 (2004).
- De Pas, T. *et al.* Phase I and pharmacologic study of weekly gemcitabine and paclitaxel in chemo-naïve patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.* **11**, 821–827 (2000).
- De Vos, M., Schreiber, V. & Dantzer, F. The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: current state of the art. *Biochem. Pharmacol.* **84**,137–146 (2012).

- DeAngelis, L. M., Kreis, W., Chan, K., Dantis, E. & Akerman, S. Pharmacokinetics of ara-C and ara-U in plasma and CSF after high-dose administration of cytosine arabinoside. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **29**,173–177 (1992).
- Decker, P. & Muller, S. Modulating poly (ADP-ribose) polymerase activity: potential for the prevention and therapy of pathogenic situations involving DNA damage and oxidative stress. *Curr Pharm Biotechnol* **3**, 275–283 (2002).
- Degan, P. *et al.* Glutathione levels in blood from ataxia telangiectasia patients suggest in vivo adaptive mechanisms to oxidative stress. *Clin. Biochem.* **40**,666–670 (2007).
- Demple, B. & Sung, J.-S. Molecular and biological roles of Ape1 protein in mammalian base excision repair. *DNA Repair (Amst.)* **4**, 1442–1449 (2005).
- Derenzini, M. The AgNORs. *Micron* **31**,117–120 (2000).
- Di Paola, S., Micaroni, M., Di Tullio, G., Buccione, R. & Di Girolamo, M. PARP16/ARTD15 is a novel endoplasmic-reticulum-associated mono-ADP-ribosyltransferase that interacts with, and modifies karyopherin- β 1. *PLoS ONE* **7**,e37352 (2012).
- Diaz, A., Vogiatzi, M. G., Sanz, M. M. & German, J. Evaluation of short stature, carbohydrate metabolism and other endocrinopathies in Bloom's syndrome. *Horm. Res.* **66**, 111–117 (2006).
- Dillehay, L. E., Jacobson-Kram, D. & Williams, J. R. DNA topoisomerases and models of sister-chromatid exchange. *Mutat. Res.* **215**, 15–23 (1989).
- Ding, R., Pommier, Y., Kang, V. H. & Smulson, M. Depletion of poly(ADP-ribose) polymerase by antisense RNA expression results in a delay in DNA strand break rejoining. *J. Biol. Chem.* **267**,12804–12812 (1992).
- Dirick, L., Moll, T., Auer, H. & Nasmyth, K. A central role for SWI6 in modulating cell cycle Start-specific transcription in yeast. *Nature* **357**, 508–513 (1992).
- Doherty, K. M. *et al.* Physical and functional mapping of the replication protein a interaction domain of the werner and bloom syndrome helicases. *J. Biol. Chem.* **280**,29494–29505 (2005).
- Doil, C. *et al.* RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. *Cell* **136**, 435–446 (2009).
- Dölle, C., Skoge, R. H., Vanlinden, M. R. & Ziegler, M. NAD biosynthesis in humans--enzymes, metabolites and therapeutic aspects. *Curr Top Med Chem* **13**,2907–2917 (2013).
- Dresler, S. L., Frattini, M. G. & Robinson-Hill, R. M. In situ enzymology of DNA replication and ultraviolet-induced DNA repair synthesis in permeable human cells. *Biochemistry* **27**, 7247–7254 (1988).
- Drosopoulos, W. C., Kosiyatrakul, S. T. & Schildkraut, C. L. BLM helicase facilitates telomere replication during leading strand synthesis of telomeres. *J. Cell Biol.* **210**, 191–208 (2015).
- Durkin, S. G. & Glover, T. W. Chromosome fragile sites. *Annu. Rev. Genet.* **41**,169–192 (2007).
- Dutertre, S. *et al.* Cell cycle regulation of the endogenous wild type Bloom's syndrome DNA helicase. *Oncogene* **19**,2731–2738 (2000).
- Dutertre, S. *et al.* Dephosphorylation and subcellular compartment change of the mitotic Bloom's syndrome DNA helicase in response to ionizing radiation. *J. Biol. Chem.* **277**, 6280–6286 (2002).
- Eladad, S. *et al.* Intra-nuclear trafficking of the BLM helicase to DNA damage-induced foci is regulated by SUMO modification. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 1351–1365 (2005).
- El-Khamisy, S. F., Masutani, M., Suzuki, H. & Caldecott, K. W. A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res.* **31**, 5526–5533 (2003).
- Ellis, N. A. *et al.* The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell* **83**,655–666 (1995).
- Engström, Y. & Rozell, B. Immunocytochemical evidence for the cytoplasmic localization and differential expression during the cell cycle of the M1 and M2 subunits of mammalian ribonucleotide reductase. *EMBO J.* **7**, 1615–1620 (1988).
- Engström, Y., Rozell, B., Hansson, H. A., Stemme, S. & Thelander, L. Localization of ribonucleotide reductase in mammalian cells. *EMBO J.* **3**, 863–867 (1984).
- Ennis, D. G., Levine, A. S., Koch, W. H. & Woodgate, R. Analysis of recA mutants with altered SOS functions. *Mutat. Res.* **336**, 39–48 (1995).
- Eriksson, S., Munch-Petersen, B., Johansson, K. & Eklund, H. Structure and function of cellular deoxyribonucleoside kinases. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 1327–1346 (2002).
- Espinosa, L., Margalef, P. & Bigas, A. Non-conventional functions for NF- κ B members: the dark side of NF- κ B. *Oncogene* **34**,2279–2287 (2015).

- Eustermann, S. *et al.* Solution structures of the two PBZ domains from human APLF and their interaction with poly(ADP-ribose). *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 241–243 (2010).
- Eykelenboom, J. K. *et al.* ATR activates the S-M checkpoint during unperturbed growth to ensure sufficient replication prior to mitotic onset. *Cell Rep* **5**, 1095–1107 (2013).
- Fanciullino R, Serdjebi C, Mollard S, *et al.* Abstract 2208: cytidine deaminase deficiency and severe toxicities upon azacytidine intake: clinical observations and experimental evidences. Proceedings: AACR 104th Annual Meeting 2013; 6 -- 10 April 2013; Washington, DC. *Cancer Res* **013**;73(8):abstract nr 2208
- Farmer, H. *et al.* Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* **434**, 917–921 (2005).
- Farnham, P. J., Slansky, J. E. & Kollmar, R. The role of E2F in the mammalian cell cycle. *Biochim. Biophys. Acta* **1155**, 125–131 (1993).
- Farrar, D. *et al.* Mutational analysis of the poly(ADP-ribosyl)ation sites of the transcription factor CTCF provides an insight into the mechanism of its regulation by poly(ADP-ribosyl)ation. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 1199–1216 (2010).
- Farrell, J. J. *et al.* Cytidine deaminase single-nucleotide polymorphism is predictive of toxicity from gemcitabine in patients with pancreatic cancer: RTOG 9704. *Pharmacogenomics J.* **12**, 395–403 (2012).
- Feijs, K. L. H., Verheugd, P. & Lüscher, B. Expanding functions of intracellular resident mono-ADP-ribosylation in cell physiology. *FEBS J.* **280**, 3519–3529 (2013).
- Feingold, M., Sklower, S. L., Willner, J. P., Desnick, R. H. & Cohen, M. M. Craniosynostosis-radial aplasia: Baller-Gerold syndrome. *Am. J. Dis. Child.* **133**, 1279–1280 (1979).
- Fenech, M. *et al.* Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* **26**, 125–132 (2011).
- Feng, L. *et al.* Role of p53 in cellular response to anticancer nucleoside analog-induced DNA damage. *Int. J. Mol. Med.* **5**, 597–604 (2000).
- Fenton, A. L., Shirodkar, P., Macrae, C. J., Meng, L. & Koch, C. A. The PARP3- and ATM-dependent phosphorylation of APLF facilitates DNA double-strand break repair. *Nucleic Acids Res.* **41**, 4080–4092 (2013).
- Ferraris, D. *et al.* Design, synthesis, and pharmacological evaluation of fluorinated tetrahydrouridine derivatives as inhibitors of cytidine deaminase. *J. Med. Chem.* **57**, 2582–2588 (2014).
- Field, M. S., Anderson, D. D. & Stover, P. J. Mthfs is an Essential Gene in Mice and a Component of the Purinosome. *Front Genet* **2**, 36 (2011).
- Fijalkowska, I. J., Dunn, R. L. & Schaaper, R. M. Genetic requirements and mutational specificity of the Escherichia coli SOS mutator activity. *J. Bacteriol.* **179**, 7435–7445 (1997).
- Finger, L. D. *et al.* The wonders of flap endonucleases: structure, function, mechanism and regulation. *Subcell. Biochem.* **62**, 301–326 (2012).
- Fisher, A. E. O., Hohegger, H., Takeda, S. & Caldecott, K. W. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 accelerates single-strand break repair in concert with poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 5597–5605 (2007).
- Fitzgerald, S. M. *et al.* Identification of functional single nucleotide polymorphism haplotypes in the cytidine deaminase promoter. *Hum. Genet.* **119**, 276–283 (2006).
- Fong, P. C. *et al.* Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N. Engl. J. Med.* **361**, 123–134 (2009).
- Foucault, F. *et al.* Characterization of a new BLM mutation associated with a topoisomerase II alpha defect in a patient with Bloom's syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 1427–1434 (1997).
- Foucault, F. *et al.* Stability of microsatellites and minisatellites in Bloom syndrome, a human syndrome of genetic instability. *Mutat. Res.* **362**, 227–236 (1996).
- Fukunaga, A. K., Marsh, S., Murry, D. J., Hurley, T. D. & McLeod, H. L. Identification and analysis of single-nucleotide polymorphisms in the gemcitabine pharmacologic pathway. *Pharmacogenomics J.* **4**, 307–314 (2004).
- Funabiki, H., Kumada, K. & Yanagida, M. Fission yeast Cut1 and Cut2 are essential for sister chromatid separation, concentrate along the metaphase spindle and form large complexes. *EMBO J.* **15**, 6617–6628 (1996).
- Funamizu, N. *et al.* Tetrahydrouridine inhibits cell proliferation through cell cycle regulation regardless of cytidine deaminase expression levels. *PLoS ONE* **7**, e37424 (2012).

- Gagné, J.-P. *et al.* Proteome-wide identification of poly(ADP-ribose) binding proteins and poly(ADP-ribose)-associated protein complexes. *Nucleic Acids Res.* **36**, 6959–6976 (2008).
- Gagné, J.-P. *et al.* Proteomic investigation of phosphorylation sites in poly(ADP-ribose) polymerase-1 and poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *J. Proteome Res.* **8**, 1014–1029 (2009).
- Gagné, J.-P., Hendzel, M. J., Droit, A. & Poirier, G. G. The expanding role of poly(ADP-ribose) metabolism: current challenges and new perspectives. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 145–151 (2006).
- Galande, S. & Kohwi-Shigematsu, T. Poly(ADP-ribose) polymerase and Ku autoantigen form a complex and synergistically bind to matrix attachment sequences. *J. Biol. Chem.* **274**, 20521–20528 (1999).
- Galmarini, C. M. *et al.* In vivo mechanisms of resistance to cytarabine in acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* **117**, 860–868 (2002).
- Galmarini, C. M. *et al.* Influence of p53 and p21(WAF1) expression on sensitivity of cancer cells to cladribine. *Biochem. Pharmacol.* **65**, 121–129 (2003).
- Galmarini, C. M. *et al.* Potential mechanisms of resistance to cytarabine in AML patients. *Leuk. Res.* **26**, 621–629 (2002).
- Galmarini, C. M. *et al.* Resistance to gemcitabine in a human follicular lymphoma cell line is due to partial deletion of the deoxycytidine kinase gene. *BMC Pharmacol.* **4**, 8 (2004).
- Gamble, M. J. & Fisher, R. P. SET and PARP1 remove DEK from chromatin to permit access by the transcription machinery. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 548–555 (2007).
- Gao, G., Guo, X. & Goff, S. P. Inhibition of retroviral RNA production by ZAP, a CCCH-type zinc finger protein. *Science* **297**, 1703–1706 (2002).
- Gao, H. *et al.* Altered poly(ADP-ribose) metabolism impairs cellular responses to genotoxic stress in a hypomorphic mutant of poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Exp. Cell Res.* **313**, 984–996 (2007).
- Garcia, P. L. *et al.* RPA alleviates the inhibitory effect of vinylphosphonate internucleotide linkages on DNA unwinding by BLM and WRN helicases. *Nucleic Acids Res.* **32**, 3771–3778 (2004).
- Gawel, D., Hamilton, M. D. & Schaaper, R. M. A novel mutator of Escherichia coli carrying a defect in the dgt gene, encoding a dGTP triphosphohydrolase. *J. Bacteriol.* **190**, 6931–6939 (2008).
- Ge, Y. *et al.* The role of cytidine deaminase and GATA1 mutations in the increased cytosine arabinoside sensitivity of Down syndrome myeloblasts and leukemia cell lines. *Cancer Res.* **64**, 728–735 (2004).
- Gelot, C., Magdalou, I. & Lopez, B. S. Replication stress in Mammalian cells and its consequences for mitosis. *Genes (Basel)* **6**, 267–298 (2015).
- Gemble, S. *et al.* Pyrimidine Pool Disequilibrium Induced by a Cytidine Deaminase Deficiency Inhibits PARP-1 Activity, Leading to the Under Replication of DNA. *PLoS Genet.* **11**, e1005384 (2015).
- German, J. & Passarge, E. Bloom's syndrome. XII. Report from the Registry for 1987. *Clin. Genet.* **35**, 57–69 (1989).
- German, J. Bloom's syndrome. *Dermatol Clin* **13**, 7–18 (1995).
- German, J. Bloom's syndrome. I. Genetical and clinical observations in the first twenty-seven patients. *Am. J. Hum. Genet.* **21**, 196–227 (1969).
- German, J. Bloom's syndrome. XX. The first 100 cancers. *Cancer Genet. Cytogenet.* **93**, 100–106 (1997).
- German, J. CYTOLOGICAL EVIDENCE FOR CROSSING-OVER IN VITRO IN HUMAN LYMPHOID CELLS. *Science* **144**, 298–301 (1964).
- German, J. *et al.* Bloom's syndrome. VI. The disorder in Israel and an estimation of the gene frequency in the Ashkenazim. *Am. J. Hum. Genet.* **29**, 553–562 (1977).
- German, J., Archibald, R. & Bloom, D. CHROMOSOMAL BREAKAGE IN A RARE AND PROBABLY GENETICALLY DETERMINED SYNDROME OF MAN. *Science* **148**, 506–507 (1965).
- German, J., Bloom, D. & Passarge, E. Bloom's syndrome XI. Progress report for 1983. *Clin. Genet.* **25**, 166–174 (1984).
- German, J., Sanz, M. M., Ciocchi, S., Ye, T. Z. & Ellis, N. A. Syndrome-causing mutations of the BLM gene in persons in the Bloom's Syndrome Registry. *Hum. Mutat.* **28**, 743–753 (2007).
- Germann, S. M. *et al.* TopBP1/Dpb11 binds DNA anaphase bridges to prevent genome instability. *J. Cell Biol.* **204**, 45–59 (2014).

- Gharibyan, V. & Youssoufian, H. Localization of the Bloom syndrome helicase to punctate nuclear structures and the nuclear matrix and regulation during the cell cycle: comparison with the Werner's syndrome helicase. *Mol. Carcinog.* **26**,261–273 (1999).
- Gianneli, F., Benson, P. F., Pawsey, S. A. & Polani, P. E. Ultraviolet light sensitivity and delayed DNA-chain maturation in Bloom's syndrome fibroblasts. *Nature***265**, 466–469 (1977).
- Giardini, M. A., Segatto, M., da Silva, M. S., Nunes, V. S. & Cano, M. I. N. Telomere and telomerase biology. *Prog Mol Biol Transl Sci***125**, 1–40 (2014).
- Gibson, B. A. & Kraus, W. L. New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 411–424 (2012).
- Gilmore, T., Gapuzan, M.-E., Kalaitzidis, D. & Starczynowski, D. Rel/NF-kappa B/I kappa B signal transduction in the generation and treatment of human cancer. *Cancer Lett.* **181**,1–9 (2002).
- Gilson, E. & Géli, V. How telomeres are replicated. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 825–838 (2007).
- Giovannetti, E. *et al.* Correlation between cytidine deaminase genotype and gemcitabine deamination in blood samples. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **27**,720–725 (2008).
- Gisselsson, D. Classification of chromosome segregation errors in cancer. *Chromosoma* **117**, 511–519 (2008).
- Glover, T. W. FUDR induction of the X chromosome fragile site: evidence for the mechanism of folic acid and thymidine inhibition. *Am. J. Hum. Genet.* **33**, 234–242 (1981).
- Glover, T. W., Berger, C., Coyle, J. & Echo, B. DNA polymerase alpha inhibition by aphidicolin induces *gaps* and breaks at common fragile sites in human chromosomes. *Hum. Genet.* **67**,136–142 (1984).
- Gon, S., Napolitano, R., Rocha, W., Coulon, S. & Fuchs, R. P. Increase in dNTP pool size during the DNA damage response plays a key role in spontaneous and induced-mutagenesis in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 19311–19316 (2011).
- Goncalves, O., Drobetsky, E. & Meuth, M. Structural alterations of the *aprt* locus induced by deoxyribonucleoside triphosphate pool imbalances in Chinese hamster ovary cells. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 1792–1799 (1984).
- Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V., Donchenko, A. P. & Blinov, V. M. Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res.* **17**,4713–4730 (1989).
- Gorgoulis, V. G. *et al.* Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature***434**, 907–913 (2005).
- Goto, M., Ishikawa, Y., Sugimoto, M. & Furuichi, Y. Werner syndrome: a changing pattern of clinical manifestations in Japan (1917~2008). *Biosci Trends* **7**,13–22 (2013).
- Gottipati, P. *et al.* Poly(ADP-ribose) polymerase is hyperactivated in homologous recombination-defective cells. *Cancer Res.* **70**,5389–5398 (2010).
- Gottschalk, A. J. *et al.* Poly(ADP-ribosyl)ation directs recruitment and activation of an ATP-dependent chromatin remodeler. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**,13770–13774 (2009).
- Gottschalk, A. J., Trivedi, R. D., Conaway, J. W. & Conaway, R. C. Activation of the SNF2 family ATPase ALC1 by poly(ADP-ribose) in a stable ALC1·PARP1-nucleosome intermediate. *J. Biol. Chem.* **287**,43527–43532 (2012).
- Gourdeau, H. *et al.* Mechanisms of uptake and resistance to troxacitabine, a novel deoxycytidine nucleoside analogue, in human leukemic and solid tumor cell lines. *Cancer Res.* **61**, 7217–7224 (2001).
- Grabarz, A. *et al.* A role for BLM in double-strand break repair pathway choice: prevention of CtIP/Mre11-mediated alternative nonhomologous end-joining. *Cell Rep* **5**, 21–28 (2013).
- Gray, J. H., Owen, R. P. & Giacomini, K. M. The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pharmacol. Ther.* **447**, 728–734 (2004).
- Gray, M. D. *et al.* The Werner syndrome protein is a DNA helicase. *Nat. Genet.* **17**, 100–103 (1997).
- Green, R. J., Phillips, D. L., Chen, A. T., Reidy, J. A. & Ragab, A. H. Effects of folate in culture medium on common fragile sites in lymphocyte chromosomes from normal and leukemic children. *Hum. Genet.* **81**, 9–12 (1988).
- Griffith, J. D. *et al.* Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* **97**, 503–514 (1999).
- Gruber, S., Haering, C. H. & Nasmyth, K. Chromosomal cohesin forms a ring. *Cell* **112**, 765–777 (2003).
- Guarino, E., Salguero, I. & Kearsey, S. E. Cellular regulation of ribonucleotide reductase in eukaryotes. *Semin. Cell Dev. Biol.* **30**, 97–103 (2014).

- Guirouilh-Barbat, J., Lambert, S., Bertrand, P. & Lopez, B. S. Is homologous recombination really an error-free process? *Front Genet* **5**,175 (2014).
- Guo, R., Rigolet, P., Zargarian, L., Fermandjian, S. & Xi, X. G. Structural and functional characterizations reveal the importance of a zinc binding domain in Bloom's syndrome helicase. *Nucleic Acids Res.* **33**,3109–3124 (2005).
- Guo, X., Carroll, J.-W. N., Macdonald, M. R., Goff, S. P. & Gao, G. The zinc finger antiviral protein directly binds to specific viral mRNAs through the CCCH zinc finger motifs. *J. Virol.* **78**, 12781–12787 (2004).
- Guzmán, E. C., Caballero, J. L. & Jiménez-Sánchez, A. Ribonucleoside diphosphate reductase is a component of the replication hyperstructure in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **43**, 487–495 (2002).
- Haddad, M. *et al.* Anti-inflammatory effects of PJ34, a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, in transient focal cerebral ischemia in mice. *Br. J. Pharmacol.* **149**,23–30 (2006).
- Haering, C. H. & Nasmyth, K. Building and breaking bridges between sister chromatids. *Bioessays* **25**,1178–1191 (2003).
- Haince, J.-F. *et al.* PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites. *J. Biol. Chem.* **283**,1197–1208 (2008).
- Håkansson, P., Hofer, A. & Thelander, L. Regulation of mammalian ribonucleotide reduction and dNTP pools after DNA damage and in resting cells. *J. Biol. Chem.* **281**, 7834–7841 (2006).
- Hakmé, A., Huber, A., Dollé, P. & Schreiber, V. The macroPARP genes Parp-9 and Parp-14 are developmentally and differentially regulated in mouse tissues. *Dev. Dyn.* **237**,209–215 (2008).
- Halappanavar, S. S. & Shah, G. M. Defective control of mitotic and post-mitotic checkpoints in poly(ADP-ribose) polymerase-1(-/-) fibroblasts after mitotic spindle disruption. *Cell Cycle* **3**, 335–342 (2004).
- Hallek, M. & Eichhorst, B. F. Chemotherapy combination treatment regimens with fludarabine in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol. J.* **5** Suppl 1, S20–30 (2004).
- Han, W., Li, X. & Fu, X. The macro domain protein family: structure, functions, and their potential therapeutic implications. *Mutat. Res.* **727**, 86–103 (2011).
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
- Hand, R. & German, J. A retarded rate of DNA chain growth in Bloom's syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 758–762 (1975).
- Hand, R. & German, J. Bloom's syndrome: DNA replication in cultured fibroblasts and lymphocytes. *Hum. Genet.* **38**,297–306 (1977).
- Hande, M. P., Samper, E., Lansdorp, P. & Blasco, M. A. Telomere length dynamics and chromosomal instability in cells derived from telomerase null mice. *J. Cell Biol.* **144**, 589–601 (1999).
- Hang, C. T. *et al.* Chromatin regulation by Brg1 underlies heart muscle development and disease. *Nature* **466**, 62–67 (2010).
- Hapke, D. M., Stegmann, A. P. & Mitchell, B. S. Retroviral transfer of deoxycytidine kinase into tumor cell lines enhances nucleoside toxicity. *Cancer Res.* **56**, 2343–2347 (1996).
- Hassa, P. O. & Hottiger, M. O. The diverse biological roles of mammalian PARPS, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases. *Front. Biosci.* **13**,3046–3082 (2008).
- Hassa, P. O. *et al.* Acetylation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by p300/CREB-binding protein regulates coactivation of NF-kappaB-dependent transcription. *J. Biol. Chem.* **280**,40450–40464 (2005).
- Hassa, P. O., Buerki, C., Lombardi, C., Imhof, R. & Hottiger, M. O. Transcriptional coactivation of nuclear factor-kappaB-dependent gene expression by p300 is regulated by poly(ADP)-ribose polymerase-1. *J. Biol. Chem.* **278**,45145–45153 (2003).
- Hassa, P. O., Haenni, S. S., Elser, M. & Hottiger, M. O. Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**,789–829 (2006).
- Hassler, M. & Ladurner, A. G. Towards a structural understanding of PARP1 activation and related signalling ADP-ribosyl-transferases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **22**, 721–729 (2012).
- Hauf, S., Waizenegger, I. C. & Peters, J. M. Cohesin cleavage by separase required for anaphase and cytokinesis in human cells. *Science* **293**,1320–1323 (2001).
- Hayakawa, S. *et al.* ZAPS is a potent stimulator of signaling mediated by the RNA helicase RIG-I during antiviral responses. *Nat. Immunol.* **12**, 37–44 (2011).
- Hengeveld, R. C. C. *et al.* Rif1 Is Required for Resolution of Ultrafine DNA Bridges in Anaphase to Ensure Genomic Stability. *Dev. Cell* **34**, 466–474 (2015).

- Herrick, J. & Bensimon, A. Introduction to molecular combing: genomics, DNA replication, and cancer. *Methods Mol. Biol.* **521**,71–101 (2009).
- Hickson, I. D. RecQ helicases: caretakers of the genome. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 169–178 (2003).
- Hochegger, H. *et al.* Parp-1 protects homologous recombination from interference by Ku and Ligase IV in vertebrate cells. *EMBO J* **25**,1305–1314 (2006).
- Hoesel, B. & Schmid, J. A. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Mol. Cancer* **12**, 86 (2013).
- Hoffelder, D. R. *et al.* Resolution of anaphase bridges in cancer cells. *Chromosoma* **112**,389–397 (2004).
- Holmberg, C. *et al.* Ddb1 controls genome stability and meiosis in fission yeast. *Genes Dev.* **19**, 853–862 (2005).
- Hori, T., Ayusawa, D. & Seno, T. Thymidylate stress and sister chromatid exchanges. *Basic Life Sci.* **29** Pt A, 149–159 (1984).
- Hori, T., Ayusawa, D., Glover, T. W. & Seno, T. Expression of fragile site on the human X chromosome in somatic cell hybrids between human fragile X cells and thymidylate synthase-negative mouse mutant cells. *Jpn. J. Cancer Res.* **76**, 977–983 (1985).
- Hottiger, M. O., Hassa, P. O., Lüscher, B., Schüler, H. & Koch-Nolte, F. Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 208–219 (2010).
- Hsiao, S. J. & Smith, S. Tankyrase function at telomeres, spindle poles, and beyond. *Biochimie* **90**, 83–92 (2008).
- Hu, C.-M. *et al.* Tumor cells require thymidylate kinase to prevent dUTP incorporation during DNA repair. *Cancer Cell* **22**, 36–50 (2012).
- Hu, P. *et al.* Evidence for BLM and Topoisomerase III α interaction in genomic stability. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 1287–1298 (2001).
- Hu, Y. *et al.* RECQL5/Recql5 helicase regulates homologous recombination and suppresses tumor formation via disruption of Rad51 presynaptic filaments. *Genes Dev.* **21**, 3073–3084 (2007).
- Huambachano, O., Herrera, F., Rancourt, A. & Satoh, M. S. Double-stranded DNA binding domain of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and molecular insight into the regulation of its activity. *J. Biol. Chem.* **286**,7149–7160 (2011).
- Huang, H. *et al.* Structure-based design of 2-aminopyridine oxazolidinones as potent and selective tankyrase inhibitors. *ACS Med Chem Lett* **4**,1218–1223 (2013).
- Huang, S. *et al.* The spectrum of WRN mutations in Werner syndrome patients. *Hum. Mutat.* **27**, 558–567 (2006).
- Huang, S.-M. A. *et al.* Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature* **461**, 614–620 (2009).
- Huber, M. D., Duquette, M. L., Shiels, J. C. & Maizels, N. A conserved G4 DNA binding domain in RecQ family helicases. *J. Mol. Biol.* **358**, 1071–1080 (2006).
- Hübner, N. C. *et al.* Re-examination of siRNA specificity questions role of PICH and Tao1 in the spindle checkpoint and identifies Mad2 as a sensitive target for small RNAs. *Chromosoma* **119**, 149–165 (2010).
- Huppert, J. L. & Balasubramanian, S. G-quadruplexes in promoters throughout the human genome. *Nucleic Acids Res.* **35**, 406–413 (2007).
- Huynh, E., Sigal, D. & Saven, A. Cladribine in the treatment of hairy cell leukemia: initial and subsequent results. *Leuk. Lymphoma* **50** Suppl 1, 12–17 (2009).
- Ikejima, M. & Gill, D. M. Poly(ADP-ribose) degradation by glycohydrolase starts with an endonucleolytic incision. *J. Biol. Chem.* **263**,11037–11040 (1988).
- Iles, N., Rulten, S., El-Khamisy, S. F. & Caldecott, K. W. APLF (C2orf13) is a novel human protein involved in the cellular response to chromosomal DNA strand breaks. *Mol. Cell. Biol.* **27**,3793–3803 (2007).
- Illuzzi, G. *et al.* PARG is dispensable for recovery from transient replicative stress but required to prevent detrimental accumulation of poly(ADP-ribose) upon prolonged replicative stress. *Nucleic Acids Res.* **42**, 7776–7792 (2014).
- Ishii, Y. & Bender, M. A. Effects of inhibitors of DNA synthesis on spontaneous and ultraviolet light-induced sister-chromatid exchanges in Chinese hamster cells. *Mutat. Res.* **79**, 19–32 (1980).
- Ishikawa, F. Portrait of replication stress viewed from telomeres. *Cancer Sci.* **104**, 790–794 (2013).
- Islam, M. N., Fox, D., Guo, R., Enomoto, T. & Wang, W. RecQL5 promotes genome stabilization through two parallel mechanisms—interacting with RNA polymerase II and acting as a helicase. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 2460–2472 (2010).
- Ivana Scovassi, A. & Diederich, M. Modulation of poly(ADP-ribosylation) in apoptotic cells. *Biochem. Pharmacol.* **68**,1041–1047 (2004).

- Jacky, P. B. & Sutherland, G. R. Thymidylate synthetase inhibitors and fragile site expression in lymphocytes. *Am. J. Hum. Genet.* **35**, 1276–1283 (1983).
- Jacobs, P. A. et al. Expression of the marker (X) (q28) in lymphoblastoid cell lines. *Am. J. Hum. Genet.* **34**, 552–557 (1982).
- Jallepalli, P. V. & Lengauer, C. Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery. *Nat. Rev. Cancer* **1**, 109–117 (2001).
- Janion, C. Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*. *Int. J. Biol. Sci.* **4**, 338–344 (2008).
- Jankevicius, G. et al. A family of macrodomain proteins reverses cellular mono-ADP-ribosylation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 508–514 (2013).
- Janscak, P. et al. Characterization and mutational analysis of the RecQ core of the bloom syndrome protein. *J. Mol. Biol.* **330**, 29–42 (2003).
- Jeggo, P. A. & Downs, J. A. Roles of chromatin remodellers in DNA double strand break repair. *Exp. Cell Res.* **329**, 69–77 (2014).
- Jeggo, P. A. & Löbrich, M. Contribution of DNA repair and cell cycle checkpoint arrest to the maintenance of genomic stability. *DNA Repair (Amst.)* **5**, 1192–1198 (2006).
- Jekunen, A. & Vilpo, J. A. 5-Methyl-2'-deoxycytidine. Metabolism and effects on cell lethality studied with human leukemic cells in vitro. *Mol. Pharmacol.* **25**, 431–435 (1984).
- Jekunen, A., Puukka, M. & Vilpo, J. Exclusion of exogenous 5-methyl-2'-deoxycytidine from DNA in human leukemic cells. A study with [2-(14)C]- and [methyl-14C]5-methyl-2'-deoxycytidine. *Biochem. Pharmacol.* **32**, 1165–1168 (1983).
- Jesser, M., Chypre, C., Hog, F. & Mandel, P. Cytoplasmic poly(ADP-ribose)polymerase from mouse plasmacytoma free messenger ribonucleoprotein particles: purification and characterization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195**, 558–564 (1993).
- Ji, Y. & Tulin, A. V. Post-transcriptional regulation by poly(ADP-ribosyl)ation of the RNA-binding proteins. *Int J Mol Sci* **14**, 16168–16183 (2013).
- Jijon, H. B. et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase attenuates inflammation in a model of chronic colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **279**, G641–G651 (2000).
- Johnson, F. B. et al. Association of the Bloom syndrome protein with topoisomerase IIIalpha in somatic and meiotic cells. *Cancer Res.* **60**, 1162–1167 (2000).
- Johnston, L. H. & Lowndes, N. F. Cell cycle control of DNA synthesis in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* **20**, 2403–2410 (1992).
- Johnston, S. J. & Carroll, J. S. Transcription factors and chromatin proteins as therapeutic targets in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1855**, 183–192 (2015).
- Jones, R. M. & Petermann, E. Replication fork dynamics and the DNA damage response. *Biochem. J.* **443**, 13–26 (2012).
- Jordheim, L. P. et al. Characterization of a gemcitabine-resistant murine leukemic cell line: reversion of in vitro resistance by a mononucleotide prodrug. *Clin. Cancer Res.* **10**, 5614–5621 (2004).
- Jordheim, L. P., Durantel, D., Zoulim, F. & Dumontet, C. Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nat Rev Drug Discov* **12**, 447–464 (2013).
- Jordheim, L. P., Guittet, O., Lepoivre, M., Galmarini, C. M. & Dumontet, C. Increased expression of the large subunit of ribonucleotide reductase is involved in resistance to gemcitabine in human mammary adenocarcinoma cells. *Mol. Cancer Ther.* **4**, 1268–1276 (2005).
- Josephsen, J., Hammer-Jespersen, K. & Hansen, T. D. Mapping of the gene for cytidine deaminase (cdd) in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **154**, 72–75 (1983).
- Ju, B.-G. et al. Activating the PARP-1 sensor component of the groucho/ TLE1 corepressor complex mediates a CaMK kinase II delta-dependent neurogenic gene activation pathway. *Cell* **119**, 815–829 (2004).
- Ju, B.-G. et al. A topoisomerase II beta-mediated dsDNA break required for regulated transcription. *Science* **312**, 1798–1802 (2006).
- Jungmichel, S. et al. Proteome-wide identification of poly(ADP-Ribosyl)ation targets in different genotoxic stress responses. *Mol. Cell* **52**, 272–285 (2013).
- Jurecka, A. Inborn errors of purine and pyrimidine metabolism. *J. Inher. Metab. Dis.* **32**, 247–263 (2009).

- Juszczynski, P. *et al.* BAL1 and BBAP are regulated by a gamma interferon-responsive bidirectional promoter and are overexpressed in diffuse large B-cell lymphomas with a prominent inflammatory infiltrate. *Mol. Cell. Biol.* **26**,5348–5359 (2006).
- Jwa, M. & Chang, P. PARP16 is a tail-anchored endoplasmic reticulum protein required for the PERK- and IRE1 α -mediated unfolded protein response. *Nat. Cell Biol.* **14**,1223–1230 (2012).
- Kääriäinen, H., Ryöppy, S. & Norio, R. RAPADILINO syndrome with radial and patellar aplasia/hypoplasia as main manifestations. *Am. J. Med. Genet.* **33**, 346–351 (1989).
- Kalisch, T., Amé, J.-C., Dantzer, F. & Schreiber, V. New readers and interpretations of poly(ADP-ribose)ation. *Trends Biochem. Sci.* **37**, 381–390 (2012).
- Kamal, A., Riyaz, S., Srivastava, A. K. & Rahim, A. Tankyrase inhibitors as therapeutic targets for cancer. *Curr Top Med Chem* **14**, 1967–1976 (2014).
- Kanagaraj, R. *et al.* RECQ5 helicase associates with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II during productive elongation phase of transcription. *Nucleic Acids Res.* **38**, 8131–8140 (2010).
- Kanai, M. *et al.* Involvement of poly(ADP-Ribose) polymerase 1 and poly(ADP-Ribosyl)ation in regulation of centrosome function. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 2451–2462 (2003).
- Kanai, Y., Ushijima, S., Kondo, Y., Nakanishi, Y. & Hirohashi, S. DNA methyltransferase expression and DNA methylation of CPG islands and peri-centromeric satellite regions in human colorectal and stomach cancers. *Int. J. Cancer* **91**, 205–212 (2001).
- Kandala, P. K., Wright, S. E. & Srivastava, S. K. Blocking epidermal growth factor receptor activation by 3,3'-diindolylmethane suppresses ovarian tumor growth in vitro and in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **341**, 24–32 (2012).
- Kaneko, H. *et al.* Microsatellite instability in B-cell lymphoma originating from Bloom syndrome. *Int. J. Cancer* **69**,480–483 (1996).
- Kannan, P., Yu, Y., Wankhade, S. & Tainsky, M. A. PolyADP-ribose polymerase is a coactivator for AP-2-mediated transcriptional activation. *Nucleic Acids Res.* **27**,866–874 (1999).
- Karlberg, T. *et al.* Structural basis for lack of ADP-ribosyltransferase activity in poly(ADP-ribose) polymerase-13/zinc finger antiviral protein. *J. Biol. Chem.* **290**,7336–7344 (2015).
- Karow, J. K., Constantinou, A., Li, J. L., West, S. C. & Hickson, I. D. The Bloom's syndrome gene product promotes branch migration of holliday junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 6504–6508 (2000).
- Karras, G. I. *et al.* The macro domain is an ADP-ribose binding module. *EMBO J.* **24**,1911–1920 (2005).
- Kashima, L. *et al.* CHFR protein regulates mitotic checkpoint by targeting PARP-1 protein for ubiquitination and degradation. *J. Biol. Chem.* **287**,12975–12984 (2012).
- Kasperek, T. R. & Humphrey, T. C. DNA double-strand break repair pathways, chromosomal rearrangements and cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* **22**, 886–897 (2011).
- Kastan, M. B. & Bartek, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* **432**, 316–323 (2004).
- Katsuno, Y. *et al.* Cyclin A-Cdk1 regulates the origin firing program in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**,3184–3189 (2009).
- Katsuragi, Y. & Sagata, N. Regulation of Chk1 kinase by autoinhibition and ATR-mediated phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* **15**,1680–1689 (2004).
- Kaulich, M., Cubizolles, F. & Nigg, E. A. On the regulation, function, and localization of the DNA-dependent ATPase PICH. *Chromosoma* **121**, 395–408 (2012).
- Kauppinen, T. M. *et al.* Direct phosphorylation and regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**,7136–7141 (2006).
- Kaur, S. *et al.* Chk1-dependent constitutive phosphorylation of BLM helicase at serine 646 decreases after DNA damage. *Mol. Cancer Res.* **8**,1234–1247 (2010).
- Ke, P.-Y., Kuo, Y.-Y., Hu, C.-M. & Chang, Z.-F. Control of dTTP pool size by anaphase promoting complex/cyclosome is essential for the maintenance of genetic stability. *Genes Dev.* **19**, 1920–1933 (2005).
- Ke, Y. *et al.* PICH and BLM limit histone association with anaphase centromeric DNA threads and promote their resolution. *EMBO J.* **30**, 3309–3321 (2011).
- Kedar, P. S., Stefanick, D. F., Horton, J. K. & Wilson, S. H. Interaction between PARP-1 and ATR in mouse fibroblasts is blocked by PARP inhibition. *DNA Repair (Amst.)* **7**,1787–1798 (2008).

- Kharat, S. S. *et al.* Mitotic phosphorylation of Bloom helicase at Thr182 is required for its proteasomal degradation and maintenance of chromosomal stability. *Oncogene* (2015).
- Khodyreva, S. N. *et al.* Apurinic/aprimidinic (AP) site recognition by the 5'-dRP/AP lyase in poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 22090–22095 (2010).
- Kiehlbauch, C. C., Aboul-Ela, N., Jacobson, E. L., Ringer, D. P. & Jacobson, M. K. High resolution fractionation and characterization of ADP-ribose polymers. *Anal. Biochem.* **208**, 26–34 (1993).
- Kim, H.-S. *et al.* Berberine-induced AMPK activation inhibits the metastatic potential of melanoma cells via reduction of ERK activity and COX-2 protein expression. *Biochem. Pharmacol.* **83**, 385–394 (2012).
- Kim, M. Y., Mauro, S., Gévry, N., Lis, J. T. & Kraus, W. L. NAD⁺-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1. *Cell* **119**, 803–814 (2004).
- Kim, M. Y., Zhang, T. & Kraus, W. L. Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: 'PAR-laying' NAD⁺ into a nuclear signal. *Genes Dev.* **19**, 1951–1967 (2005).
- Kim, S. H., Li, C. & Maller, J. L. A maternal form of the phosphatase Cdc25A regulates early embryonic cell cycles in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **212**, 381–391 (1999).
- Kim, T. M. *et al.* Anti-cancer activity of gemcitabine against natural killer cell leukemia/lymphoma. *Leuk. Lymphoma* **55**, 940–943 (2014).
- Kitano, K. Structural mechanisms of human RecQ helicases WRN and BLM. *Front Genet* **5**, 366 (2014).
- Kitano, K., Kim, S.-Y. & Hakoshima, T. Structural basis for DNA strand separation by the unconventional winged-helix domain of RecQ helicase WRN. *Structure* **18**, 177–187 (2010).
- Kitano, K., Yoshihara, N. & Hakoshima, T. Crystal structure of the HRDC domain of human Werner syndrome protein, WRN. *J. Biol. Chem.* **282**, 2717–2728 (2007).
- Kitao, S., Lindor, N. M., Shiratori, M., Furuichi, Y. & Shimamoto, A. Rothmund-thomson syndrome responsible gene, RECQL4: genomic structure and products. *Genomics* **61**, 268–276 (1999).
- Kleine, H. *et al.* Substrate-assisted catalysis by PARP10 limits its activity to mono-ADP-ribosylation. *Mol. Cell* **32**, 57–69 (2008).
- Klungland, A. *et al.* Base excision repair of oxidative DNA damage activated by XPG protein. *Mol. Cell* **3**, 33–42 (1999).
- Knoch, J., Kamenisch, Y., Kubisch, C. & Berneburg, M. Rare hereditary diseases with defects in DNA-repair. *Eur J Dermatol* **22**, 443–455 (2012).
- Kobbe, C. von *et al.* Central role for the Werner syndrome protein/poly(ADP-ribose) polymerase 1 complex in the poly(ADP-ribosyl)ation pathway after DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 8601–8613 (2003).
- Kobbe, C. von *et al.* Poly(ADP-ribose) polymerase 1 regulates both the exonuclease and helicase activities of the Werner syndrome protein. *Nucleic Acids Res.* **32**, 4003–4014 (2004).
- Kobbe, C. von, Thomä, N. H., Czyzewski, B. K., Pavletich, N. P. & Bohr, V. A. Werner syndrome protein contains three structure-specific DNA binding domains. *J. Biol. Chem.* **278**, 52997–53006 (2003).
- Koç, A., Wheeler, L. J., Mathews, C. K. & Merrill, G. F. Hydroxyurea arrests DNA replication by a mechanism that preserves basal dNTP pools. *J. Biol. Chem.* **279**, 223–230 (2004).
- Koç, A., Wheeler, L. J., Mathews, C. K. & Merrill, G. F. Replication-independent MCB gene induction and deoxyribonucleotide accumulation at G1/S in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **278**, 9345–9352 (2003).
- Koch, C., Moll, T., Neuberg, M., Ahorn, H. & Nasmyth, K. A role for the transcription factors Mbp1 and Swi4 in progression from G1 to S phase. *Science* **261**, 1551–1557 (1993).
- Kogoma, T. Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 212–238 (1997).
- Kohalmi, S. E., Glattke, M., McIntosh, E. M. & Kunz, B. A. Mutational specificity of DNA precursor pool imbalances in yeast arising from deoxycytidylate deaminase deficiency or treatment with thymidylate. *J. Mol. Biol.* **220**, 933–946 (1991).
- Kohen, E. *et al.* Metabolic control and compartmentation in single living cells. *Cell Biochem. Funct.* **1**, 3–16 (1983).
- Kohno, M., Tanimura, S. & Ozaki, K. Targeting the extracellular signal-regulated kinase pathway in cancer therapy. *Biol. Pharm. Bull.* **34**, 1781–1784 (2011).
- Kohzaki, M. *et al.* The helicase domain and C-terminus of human RecQL4 facilitate replication elongation on DNA templates damaged by ionizing radiation. *Carcinogenesis* **33**, 1203–1210 (2012).

- Kolodner, R. D., Putnam, C. D. & Myung, K. Maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **297**, 552–557 (2002).
- Kong, W., Engel, K. & Wang, J. Mammalian nucleoside transporters. *Curr. Drug Metab.* **5**, 63–84 (2004).
- Korkmaz, A. *et al.* Effects of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition in bladder damage caused by cyclophosphamide in rats. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **233**, 338–343 (2008).
- Kotova, E., Pinnola, A. D. & Tulin, A. V. Small-molecule collection and high-throughput colorimetric assay to identify PARP1 inhibitors. *Methods Mol. Biol.* **780**, 491–516 (2011).
- Kraus, W. L. & Lis, J. T. PARP goes transcription. *Cell* **113**, 677–683 (2003).
- Kraus, W. L. Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**, 294–302 (2008).
- Kreuzer, K. N. Interplay between DNA replication and recombination in prokaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**, 43–67 (2005).
- Krietsch, J. *et al.* Reprogramming cellular events by poly(ADP-ribose)-binding proteins. *Mol. Aspects Med.* **34**, 1066–1087 (2013).
- Krishnakumar, R. & Kraus, W. L. The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets. *Mol. Cell* **39**, 8–24 (2010).
- Kroep, J. R. *et al.* Sequence dependent effect of paclitaxel on gemcitabine metabolism in relation to cell cycle and cytotoxicity in non-small-cell lung cancer cell lines. *Br. J. Cancer* **83**, 1069–1076 (2000).
- Kühn, K., Bertling, W. M. & Emmrich, F. Cloning of a functional cDNA for human cytidine deaminase (CDD) and its use as a marker of monocyte/macrophage differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190**, 1–7 (1993).
- Kumar, D., Viberg, J., Nilsson, A. K. & Chabes, A. Highly mutagenic and severely imbalanced dNTP pools can escape detection by the S-phase checkpoint. *Nucleic Acids Res.* **38**, 3975–3983 (2010).
- Kunkel, T. A. DNA replication fidelity. *J. Biol. Chem.* **267**, 18251–18254 (1992).
- Kunkel, T. A. Exonucleolytic proofreading. *Cell* **53**, 837–840 (1988).
- Kunkel, T. A. Misalignment-mediated DNA synthesis errors. *Biochemistry* **29**, 8003–8011 (1990).
- Kunz, B. A. *et al.* International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Deoxyribonucleoside triphosphate levels: a critical factor in the maintenance of genetic stability. *Mutat. Res.* **318**, 1–64 (1994).
- Kustatscher, G., Hothorn, M., Pugieux, C., Scheffzek, K. & Ladurner, A. G. Splicing regulates NAD metabolite binding to histone macroH2A. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 624–625 (2005).
- Labib, K. & De Piccoli, G. Surviving chromosome replication: the many roles of the S-phase checkpoint pathway. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **366**, 3554–3561 (2011).
- Lacal, P. M. *et al.* Pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase activity down-regulates the expression of syndecan-4 and Id-1 in endothelial cells. *Int. J. Oncol.* **34**, 861–872 (2009).
- Lahkim Bennani-Belhaj, K. *et al.* The Bloom syndrome protein limits the lethality associated with RAD51 deficiency. *Mol. Cancer Res.* **8**, 385–394 (2010).
- Lai, A. Y. & Wade, P. A. Cancer biology and NuRD: a multifaceted chromatin remodelling complex. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 588–596 (2011).
- Laliberté, J. & Momparler, R. L. Human cytidine deaminase: purification of enzyme, cloning, and expression of its complementary DNA. *Cancer Res.* **54**, 5401–5407 (1994).
- Laliberté, J., Marquez, V. E. & Momparler, R. L. Potent inhibitors for the deamination of cytosine arabinoside and 5-aza-2'-deoxycytidine by human cytidine deaminase. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **30**, 7–11 (1992).
- Lane, A. N. & Fan, T. W.-M. Regulation of mammalian nucleotide metabolism and biosynthesis. *Nucleic Acids Res.* **43**, 2466–2485 (2015).
- Lange, B. M. H., Rebollo, E., Herold, A. & González, C. Cdc37 is essential for chromosome segregation and cytokinesis in higher eukaryotes. *EMBO J.* **21**, 5364–5374 (2002).
- Langelier, M.-F. & Pascal, J. M. PARP-1 mechanism for coupling DNA damage detection to poly(ADP-ribose) synthesis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **23**, 134–143 (2013).

- Langelier, M.-F., Ruhl, D. D., Planck, J. L., Kraus, W. L. & Pascal, J. M. The Zn³ domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) functions in both DNA-dependent poly(ADP-ribose) synthesis activity and chromatin compaction. *J. Biol. Chem.* **285**,18877–18887 (2010).
- Langelier, M.-F., Planck, J. L., Roy, S. & Pascal, J. M. Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosyl)ation by human PARP-1. *Science* **336**,728–732 (2012).
- Langelier, M.-F., Servent, K. M., Rogers, E. E. & Pascal, J. M. A third zinc-binding domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 coordinates DNA-dependent enzyme activation. *J. Biol. Chem.***283**, 4105–4114 (2008).
- Larizza, L., Roversi, G. & Volpi, L. Rothmund-Thomson syndrome. *Orphanet J Rare Dis* **5**, 2 (2010).
- Larsen, D. H. *et al.* The chromatin-remodeling factor CHD4 coordinates signaling and repair after DNA damage. *J. Cell Biol.* **190**, 731–740 (2010).
- Latt, S. A. Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **70**,3395–3399 (1973).
- Lauper, J. M., Krause, A., Vaughan, T. L. & Monnat, R. J. Spectrum and risk of neoplasia in Werner syndrome: a systematic review. *PLoS ONE* **8**, e59709 (2013).
- Le Beau, M. M. *et al.* Replication of a common fragile site, FRA3B, occurs late in S phase and is delayed further upon induction: implications for the mechanism of fragile site induction. *Hum. Mol. Genet.* **7**,755–761 (1998).
- Le Tallec, B. *et al.*Updating the mechanisms of common fragile site instability: how to reconcile the different views? *Cell. Mol. Life Sci.* **71**,4489–4494 (2014).
- Leanza, L., Ferraro, P., Reichard, P. & Bianchi, V. Metabolic interrelations within guanine deoxynucleotide pools for mitochondrial and nuclear DNA maintenance. *J. Biol. Chem.* **283**, 16437–16445 (2008).
- Lee, J. W. *et al.* Modulation of Werner syndrome protein function by a single mutation in the conserved RecQ domain. *J. Biol. Chem.* **280**,39627–39636 (2005).
- Lee, K. H., Abe, S., Yanabe, Y., Matsuda, I. & Yoshida, M. C. Superoxide dismutase activity and chromosome damage in cultured chromosome instability syndrome cells. *Mutat. Res.* **244**,251–256 (1990).
- Lee, O.-H. *et al.* Genome-wide YFP fluorescence complementation screen identifies new regulators for telomere signaling in human cells.*Mol. Cell Proteomics* **10**,M110.001628 (2011).
- Leng, M. *et al.* MPS1-dependent mitotic BLM phosphorylation is important for chromosome stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**,11485–11490 (2006).
- León-Ortiz, A. M., Svendsen, J. & Boulton, S. J. Metabolism of DNA secondary structures at the eukaryotic replication fork. *DNA Repair (Amst.)* **19**, 152–162 (2014).
- LeRoy, G., Carroll, R., Kyin, S., Seki, M. & Cole, M. D. Identification of RecQL1 as a Holliday junction processing enzyme in human cell lines. *Nucleic Acids Res.* **33**,6251–6257 (2005).
- Letessier, A. *et al.*Cell-type-specific replication initiation programs set fragility of the FRA3B fragile site.*Nature* **470**, 120–123 (2011).
- Leung, A., Todorova, T., Ando, Y. & Chang, P. Poly(ADP-ribose) regulates post-transcriptional gene regulation in the cytoplasm. *RNA Biol* **9**, 542–548 (2012).
- Li, B., Navarro, S.v, Kasahara, N. & Comai, L. Identification and biochemical characterization of a Werner's syndrome protein complex with Ku70/80 and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *J. Biol. Chem.* **279**, 13659–13667 (2004).
- Li, G.-Y. *et al.* Structure and identification of ADP-ribose recognition motifs of APLF and role in the DNA damage response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**,9129–9134 (2010).
- Li, L. J., Naeve, G. S. & Lee, A. S. Temporal regulation of cyclin A-p107 and p33cdk2 complexes binding to a human thymidine kinase promoter element important for G1-S phase transcriptional regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 3554–3558 (1993).
- Li, M., Pokharel, S., Wang, J.-T., Xu, X. & Liu, Y. RECQ5-dependent SUMOylation of DNA topoisomerase I prevents transcription-associated genome instability. *Nat Commun* **6**, 6720 (2015).
- Li, N. & Chen, J. ADP-ribosylation: activation, recognition, and removal. *Mol. Cells* **37**, 9–16 (2014).
- Lillard-Wetherell, K. *et al.* Association and regulation of the BLM helicase by the telomere proteins TRF1 and TRF2. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 1919–1932 (2004).
- Lin, S.-J. & Guarente, L. Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease. *Curr. Opin. Cell Biol.***15**, 241–246 (2003).

- Lin, W., Amé, J. C., Aboul-Ela, N., Jacobson, E. L. & Jacobson, M. K. Isolation and characterization of the cDNA encoding bovine poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *J. Biol. Chem.* **272**, 11895–11901 (1997).
- Lin, Y., Tang, X., Zhu, Y., Shu, T. & Han, X. Identification of PARP-1 as one of the transcription factors binding to the repressor element in the promoter region of COX-2. *Arch. Biochem. Biophys.* **505**, 123–129 (2011).
- Lindahl, T. & Wood, R. D. Quality control by DNA repair. *Science* **286**, 1897–1905 (1999).
- Lindahl, T., Karran, P., Demple, B., Sedgwick, B. & Harris, A. Inducible DNA repair enzymes involved in the adaptive response to alkylating agents. *Biochimie* **64**, 581–583 (1982).
- Liu, C., Wu, J., Paudyal, S. C., You, Z. & Yu, X. CHFR is important for the first wave of ubiquitination at DNA damage sites. *Nucleic Acids Res.* **41**, 1698–1710 (2013).
- Liu, J. L., Rigolet, P., Dou, S.-X., Wang, P.-Y. & Xi, X. G. The zinc finger motif of Escherichia coli RecQ is implicated in both DNA binding and protein folding. *J. Biol. Chem.* **279**, 42794–42802 (2004).
- Liu, Q. *et al.* Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev.* **14**, 1448–1459 (2000).
- Liu, Y. & West, S. C. More complexity to the Bloom's syndrome complex. *Genes Dev.* **22**, 2737–2742 (2008).
- Liu, Y., Nielsen, C. F., Yao, Q. & Hickson, I. D. The origins and processing of ultra fine anaphase DNA bridges. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **26**, 1–5 (2014).
- Loeffler, P. A. *et al.* Structural studies of the PARP-1 BRCT domain. *BMC Struct. Biol.* **11**, 37 (2011).
- London, R. E. The structural basis of XRCC1-mediated DNA repair. *DNA Repair (Amst.)* **30**, 90–103 (2015).
- Losada, A. Cohesin in cancer: chromosome segregation and beyond. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 389–393 (2014).
- Losada, A. Cohesin regulation: fashionable ways to wear a ring. *Chromosoma* **116**, 321–329 (2007).
- Losada, A., Hirano, M. & Hirano, T. Cohesin release is required for sister chromatid resolution, but not for condensin-mediated compaction, at the onset of mitosis. *Genes Dev.* **16**, 3004–3016 (2002).
- Lowndes, N. F., Johnson, A. L., Breeden, L. & Johnston, L. H. SWI6 protein is required for transcription of the periodically expressed DNA synthesis genes in budding yeast. *Nature* **357**, 505–508 (1992).
- Lu, Q., Zhang, X., Almaula, N., Mathews, C. K. & Inouye, M. The gene for nucleoside diphosphate kinase functions as a mutator gene in Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* **254**, 337–341 (1995).
- Ludovini, V. *et al.* Association of cytidine deaminase and xeroderma pigmentosum group D polymorphisms with response, toxicity, and survival in cisplatin/gemcitabine-treated advanced non-small cell lung cancer patients. *J Thorac Oncol* **6**, 2018–2026 (2011).
- Lukas, C. *et al.* 53BP1 nuclear bodies form around DNA lesions generated by mitotic transmission of chromosomes under replication stress. *Nat. Cell Biol.* **13**, 243–253 (2011).
- Luo, X. & Kraus, W. L. On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1. *Genes Dev.* **26**, 417–432 (2012).
- Lushchak, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem. Biol. Interact.* **224C**, 164–175 (2014).
- Ma, K. *et al.* Common fragile sites: genomic hotspots of DNA damage and carcinogenesis. *Int J Mol Sci* **13**, 11974–11999 (2012).
- Machwe, A., Xiao, L., Groden, J. & Orren, D. K. The Werner and Bloom syndrome proteins catalyze regression of a model replication fork. *Biochemistry* **45**, 13939–13946 (2006).
- Mack, T. G. *et al.* Wallerian degeneration of injured axons and synapses is delayed by a Ube4b/Nmnat chimeric gene. *Nat. Neurosci.* **4**, 1199–1206 (2001).
- MacPherson, L. *et al.* 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin poly(ADP-ribose) polymerase (TiPARP, ARTD14) is a mono-ADP-ribosyltransferase and repressor of aryl hydrocarbon receptor transactivation. *Nucleic Acids Res.* **41**, 1604–1621 (2013).
- Maeda, Y. *et al.* PARP-2 interacts with TTF-1 and regulates expression of surfactant protein-B. *J. Biol. Chem.* **281**, 9600–9606 (2006).
- Magdalou, I., Lopez, B. S., Pasero, P. & Lambert, S. A. E. The causes of replication stress and their consequences on genome stability and cell fate. *Semin. Cell Dev. Biol.* **30**, 154–164 (2014).
- Magni, G. *et al.* Structure and function of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase. *Curr. Med. Chem.* **11**, 873–885 (2004).

- Maufouz, R. Z. *et al.* Increased CDA expression/activity in males contributes to decreased cytidine analog half-life and likely contributes to worse outcomes with 5-azacytidine or decitabine therapy. *Clin. Cancer Res.* **19**, 938–948 (2013).
- Mahlknecht, U. *et al.* SNP analyses in cytarabine metabolizing enzymes in AML patients and their impact on treatment response and patient survival: identification of CDA SNP C-451T as an independent prognostic parameter for survival. *Leukemia* **23**, 1929–1932 (2009).
- Malanga, M. & Althaus, F. R. Poly(ADP-ribose) reactivates stalled DNA topoisomerase I and Induces DNA strand break resealing. *J. Biol. Chem.* **279**, 5244–5248 (2004).
- Maley, F. & Maley, G. F. A tale of two enzymes, deoxycytidylate deaminase and thymidylate synthase. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **39**, 49–80 (1990).
- Maley, G. F., Lobo, A. P. & Maley, F. Properties of an affinity-column-purified human deoxycytidylate deaminase. *Biochim. Biophys. Acta* **1162**, 161–170 (1993).
- Mangerich, A. *et al.* Quantitative analysis of WRN exonuclease activity by isotope dilution mass spectrometry. *Mech. Ageing Dev.* **133**, 575–579 (2012).
- Mannava, S. *et al.* Direct role of nucleotide metabolism in C-MYC-dependent proliferation of melanoma cells. *Cell Cycle* **7**, 2392–2400 (2008).
- Mansour, W. Y., Rhein, T. & Dahm-Daphi, J. The alternative end-joining pathway for repair of DNA double-strand breaks requires PARP1 but is not dependent upon microhomologies. *Nucleic Acids Res.* **38**, 6065–6077 (2010).
- Månsson, E., Spasokoukotskaja, T., Sällström, J., Eriksson, S. & Albertioni, F. Molecular and biochemical mechanisms of fludarabine and cladribine resistance in a human promyelocytic cell line. *Cancer Res.* **59**, 5956–5963 (1999).
- Manthei, K. A. & Keck, J. L. The BLM dissolvosome in DNA replication and repair. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 4067–4084 (2013).
- Marchetti, C. *et al.* Olaparib, PARP1 inhibitor in ovarian cancer. *Expert Opin Investig Drugs* **21**, 1575–1584 (2012).
- Maring, J. G. *et al.* Pharmacokinetics of gemcitabine in non-small-cell lung cancer patients: impact of the 79A>C cytidine deaminase polymorphism. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **66**, 611–617 (2010).
- Markert, M. L. Purine nucleoside phosphorylase deficiency. *Immunodeficiency Rev* **3**, 45–81 (1991).
- Martin, N. *et al.* PARP-1 transcriptional activity is regulated by sumoylation upon heat shock. *EMBO J.* **28**, 3534–3548 (2009).
- Martín-Oliva, D. *et al.* Crosstalk between PARP-1 and NF-kappaB modulates the promotion of skin neoplasia. *Oncogene* **23**, 5275–5283 (2004).
- Martin-Oliva, D. *et al.* Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase modulates tumor-related gene expression, including hypoxia-inducible factor-1 activation, during skin carcinogenesis. *Cancer Res.* **66**, 5744–5756 (2006).
- Martomo, S. A. & Mathews, C. K. Effects of biological DNA precursor pool asymmetry upon accuracy of DNA replication in vitro. *Mutat. Res.* **499**, 197–211 (2002).
- Mashimo, M., Kato, J. & Moss, J. Structure and function of the ARH family of ADP-ribosyl-acceptor hydrolases. *DNA Repair (Amst.)* **23**, 88–94 (2014).
- Masłowska, K. H., Makiela-Dzubska, K., Fijałkowska, I. J. & Schaaper, R. M. Suppression of the *E. Coli* SOS response by dNTP pool changes. *Nucleic Acids Res.* **43**, 4109–4120 (2015).
- Masutani, M., Nakagama, H. & Sugimura, T. Poly(ADP-ribosyl)ation in relation to cancer and autoimmune disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 769–783 (2005).
- Mathew, P. The bifunctional role of steroid hormones: implications for therapy in prostate cancer. *Oncology (Williston Park, N.Y.)* **28**, 397–404 (2014).
- Mathews, C. K. & Ji, J. DNA precursor asymmetries, replication fidelity, and variable genome evolution. *Bioessays* **14**, 295–301 (1992).
- Mathews, C. K. Deoxyribonucleotides as genetic and metabolic regulators. *FASEB J.* **28**, 3832–3840 (2014).
- Mathews, C. K. DNA precursor metabolism and genomic stability. *FASEB J.* **20**, 1300–1314 (2006).
- Mattano, S. S., Palella, T. D. & Mitchell, B. S. Mutations induced at the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase locus of human T-lymphoblasts by perturbations of purine deoxyribonucleoside triphosphate pools. *Cancer Res.* **50**, 4566–4571 (1990).
- Mazloun, N. & Holloman, W. K. Brh2 promotes a template-switching reaction enabling recombinational bypass of lesions during DNA synthesis. *Mol. Cell* **36**, 620–630 (2009).
- McClintock, B. The Stability of Broken Ends of Chromosomes in Zea Mays. *Genetics* **26**, 234–282 (1941).

- McFarlane, R. J. & Humphrey, T. C. A role for recombination in centromere function. *Trends Genet.* **26**, 209–213 (2010).
- McIntosh, E. M. MCB elements and the regulation of DNA replication genes in yeast. *Curr. Genet.* **24**, 185–192 (1993).
- McIntosh, E. M., Gadsden, M. H. & Haynes, R. H. Transcription of genes encoding enzymes involved in DNA synthesis during the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 363–366 (1986).
- McVey, M., Larocque, J. R., Adams, M. D. & Sekelsky, J. J. Formation of deletions during double-strand break repair in *Drosophila* DmBlm mutants occurs after strand invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 15694–15699 (2004).
- Meder, V. S., Boeglin, M., de Murcia, G. & Schreiber, V. PARP-1 and PARP-2 interact with nucleophosmin/B23 and accumulate in transcriptionally active nucleoli. *J. Cell. Sci.* **118**, 211–222 (2005).
- Meeteij, A. R. *et al.* A multiprotein nuclear complex connects Fanconi anemia and Bloom syndrome. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 3417–3426 (2003).
- Mehrotra, P. V. *et al.* DNA repair factor APLF is a histone chaperone. *Mol. Cell* **41**, 46–55 (2011).
- Mehrotra, P. *et al.* PARP-14 functions as a transcriptional switch for Stat6-dependent gene activation. *J. Biol. Chem.* **286**, 1767–1776 (2011).
- Mehta, G. D., Rizvi, S. M. A. & Ghosh, S. K. Cohesin: a guardian of genome integrity. *Biochim. Biophys. Acta* **1823**, 1324–1342 (2012).
- Mendoza-Alvarez, H. & Alvarez-Gonzalez, R. Biochemical characterization of mono(ADP-ribosyl)ated poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochemistry* **38**, 3948–3953 (1999).
- Mercier, C. *et al.* Early severe toxicities after capecitabine intake: possible implication of a cytidine deaminase extensive metabolizer profile. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **63**, 1177–1180 (2009).
- Mercier, C. *et al.* Toxic death case in a patient undergoing gemcitabine-based chemotherapy in relation with cytidine deaminase downregulation. *Pharmacogenet. Genomics* **17**, 841–844 (2007).
- Merrill, G. F., Morgan, B. A., Lowndes, N. F. & Johnston, L. H. DNA synthesis control in yeast: an evolutionarily conserved mechanism for regulating DNA synthesis genes? *Bioessays* **14**, 823–830 (1992).
- Messner, S. *et al.* Sumoylation of poly(ADP-ribose) polymerase 1 inhibits its acetylation and restrains transcriptional coactivator function. *FASEB J.* **23**, 3978–3989 (2009).
- Meuth, M. Role of deoxynucleoside triphosphate pools in the cytotoxic and mutagenic effects of DNA alkylating agents. *Somatic Cell Genet.* **7**, 89–102 (1981).
- Meuth, M. Sensitivity of a mutator gene in Chinese hamster ovary cell to deoxynucleoside triphosphate pool alterations. *Mol. Cell. Biol.* **1**, 652–660 (1981).
- Meyer-Ficca, M. L., Meyer, R. G., Coyle, D. L., Jacobson, E. L. & Jacobson, M. K. Human poly(ADP-ribose) glycohydrolase is expressed in alternative splice variants yielding isoforms that localize to different cell compartments. *Exp. Cell Res.* **297**, 521–532 (2004).
- Meyer-Ficca, M. L. *et al.* Poly(ADP-ribose) polymerases PARP1 and PARP2 modulate topoisomerase II beta (TOP2B) function during chromatin condensation in mouse spermiogenesis. *Biol. Reprod.* **84**, 900–909 (2011).
- Michel, B. *et al.* Rescue of arrested replication forks by homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 8181–8188 (2001).
- Micozzi, D. *et al.* Human cytidine deaminase: a biochemical characterization of its naturally occurring variants. *Int. J. Biol. Macromol.* **63**, 64–74 (2014).
- Micozzi, D. *et al.* Role of tyrosine 33 residue for the stabilization of the tetrameric structure of human cytidine deaminase. *Int. J. Biol. Macromol.* **47**, 471–482 (2010).
- Milano, G., Chamorey, A.-L. & Thyss, A. [Clinical pharmacology of nucleoside analogues]. *Bull. Cancer* **89** Spec No, S71–S75 (2002).
- Miller, J. H. *et al.* *Escherichia coli* strains (ndk) lacking nucleoside diphosphate kinase are powerful mutators for base substitutions and frameshifts in mismatch-repair-deficient strains. *Genetics* **162**, 5–13 (2002).
- Mills, M. *et al.* Unusual DNA conformations: implications for telomeres. *Curr Med Chem Anticancer Agents* **2**, 627–644 (2002).
- Min, W. & Wang, Z.-Q. Poly (ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) and its therapeutic potential. *Front Biosci (Landmark Ed)* **14**, 1619–1626 (2009).

- Min, W. *et al.* Poly(ADP-ribose) binding to Chk1 at stalled replication forks is required for S-phase checkpoint activation. *Nat Commun* **4**, 2993 (2013).
- Mini, E., Nobili, S., Caciagli, B., Landini, I. & Mazzei, T. Cellular pharmacology of gemcitabine. *Ann. Oncol.* **17 Suppl 5**, v7–12 (2006).
- Minuesa, G. *et al.* Drug uptake transporters in antiretroviral therapy. *Pharmacol. Ther.* **132**, 268–279 (2011).
- Miranda, E. A., Dantzer, F., O'Farrell, M., de Murcia, G. & de Murcia, J. M. Characterisation of a gain-of-function mutant of poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **212**, 317–325 (1995).
- Misawa, A. & Inoue, S. Estrogen-Related Receptors in Breast Cancer and Prostate Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)* **6**, 83 (2015).
- Miwa, M. *et al.* High susceptibility of human cancer xenografts with higher levels of cytidine deaminase to a 2'-deoxycytidine antimetabolite, 2'-deoxy-2'-methylidenecytidine. *Clin. Cancer Res.* **4**, 493–497 (1998).
- Mladenov, E. & Iliakis, G. Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutat. Res.* **711**, 61–72 (2011).
- Mohaghegh, P., Karow, J. K., Brosh, R. M., Bohr, V. A. & Hickson, I. D. The Bloom's and Werner's syndrome proteins are DNA structure-specific helicases. *Nucleic Acids Res.* **29**, 2843–2849 (2001).
- Molina-Arcas, M. *et al.* Equilibrative nucleoside transporter-2 (hENT2) protein expression correlates with ex vivo sensitivity to fludarabine in chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Leukemia* **19**, 64–68 (2005).
- Montgomery, E. *et al.* Analysis of anaphase figures in routine histologic sections distinguishes chromosomally unstable from chromosomally stable malignancies. *Cancer Biol. Ther.* **2**, 248–252 (2003).
- Morita, T., Matsuzaki, A., Kurokawa, S. & Tokue, A. Forced expression of cytidine deaminase confers sensitivity to capecitabine. *Oncology* **65**, 267–274 (2003).
- Morozov, V., Mushegian, A. R., Koonin, E. V. & Bork, P. A putative nucleic acid-binding domain in Bloom's and Werner's syndrome helicases. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 417–418 (1997).
- Mortusewicz, O., Amé, J.-C., Schreiber, V. & Leonhardt, H. Feedback-regulated poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1 is required for rapid response to DNA damage in living cells. *Nucleic Acids Res.* **35**, 7665–7675 (2007).
- Moss, J. *et al.* Break-induced ATR and Ddb1-Cul4(Cdt)2 ubiquitin ligase-dependent nucleotide synthesis promotes homologous recombination repair in fission yeast. *Genes Dev.* **24**, 2705–2716 (2010).
- Moss, J. *et al.* Molecular and immunological characterization of ADP-ribosylarginine hydrolases. *J. Biol. Chem.* **267**, 10481–10488 (1992).
- Mota, R. A. *et al.* Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase attenuates the severity of acute pancreatitis and associated lung injury. *Lab. Invest.* **85**, 1250–1262 (2005).
- Mun, B. J. & Mathews, C. K. Cell cycle-dependent variations in deoxyribonucleotide metabolism among Chinese hamster cell lines bearing the Thy- mutator phenotype. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 20–26 (1991).
- Murnane, J. P. Telomere dysfunction and chromosome instability. *Mutat. Res.* **730**, 28–36 (2012).
- Murthy, S. & Reddy, G. P.-V. Replisome: complete machinery for DNA synthesis. *J. Cell. Physiol.* **209**, 711–717 (2006).
- Naim, V. & Rosselli, F. The FANCD1 pathway and BLM collaborate during mitosis to prevent micro-nucleation and chromosome abnormalities. *Nat. Cell Biol.* **11**, 761–768 (2009).
- Naim, V., Wilhelm, T., Debatisse, M. & Rosselli, F. ERCC1 and MUS81-EME1 promote sister chromatid separation by processing late replication intermediates at common fragile sites during mitosis. *Nat. Cell Biol.* **15**, 1008–1015 (2013).
- Nakajima, M. *et al.* The complete removal of cohesin from chromosome arms depends on separase. *J. Cell. Sci.* **120**, 4188–4196 (2007).
- Nakanishi, M., Katsuno, Y., Niida, H., Murakami, H. & Shimada, M. Chk1-cyclin A/Cdk1 axis regulates origin firing programs in mammals. *Chromosome Res.* **18**, 103–113 (2010).
- Narwal, M., Fallarero, A., Vuorela, P. & Lehtiö, L. Homogeneous screening assay for human tankyrase. *J. Biomol. Screen* **17**, 593–604 (2012).
- Naura, A. S. *et al.* Reciprocal regulation of iNOS and PARP-1 during allergen-induced eosinophilia. *Eur. Respir. J.* **33**, 252–262 (2009).
- Newman, J. A. *et al.* Crystal structure of the Bloom's syndrome helicase indicates a role for the HRDC domain in conformational changes. *Nucleic Acids Res.* **43**, 5221–5235 (2015).

- Ng, C.-P. *et al.* Differential mode of regulation of the checkpoint kinases CHK1 and CHK2 by their regulatory domains. *J. Biol. Chem.* **279**, 8808–8819 (2004).
- Nguyen, G. H. *et al.* Regulation of gene expression by the BLM helicase correlates with the presence of G-quadruplex DNA motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 9905–9910 (2014).
- Nicolás, L. *et al.* Loss of poly(ADP-ribose) polymerase-2 leads to rapid development of spontaneous T-cell lymphomas in p53-deficient mice. *Oncogene* **29**, 2877–2883 (2010).
- Nicotera, T. M., Notaro, J., Notaro, S., Schurer, J. & Sandberg, A. A. Elevated superoxide dismutase in Bloom's syndrome: a genetic condition of oxidative stress. *Cancer Res.* **49**, 5239–5243 (1989).
- Nicotera, T., Thusu, K. & Dandona, P. Elevated production of active oxygen in Bloom's syndrome cell lines. *Cancer Res.* **53**, 5104–5107 (1993).
- Niere, M. *et al.* ADP-ribosylhydrolase 3 (ARH3), not poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) isoforms, is responsible for degradation of mitochondrial matrix-associated poly(ADP-ribose). *J. Biol. Chem.* **287**, 16088–16102 (2012).
- Nies, A. T. *et al.* Expression of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) is affected by genetic factors and cholestasis in human liver. *Hepatology* **50**, 1227–1240 (2009).
- Niida, H. *et al.* Essential role of Tip60-dependent recruitment of ribonucleotide reductase at DNA damage sites in DNA repair during G1 phase. *Genes Dev.* **24**, 333–338 (2010).
- Niida, H. *et al.* Depletion of Chk1 leads to premature activation of Cdc2-cyclin B and mitotic catastrophe. *J. Biol. Chem.* **280**, 39246–39252 (2005).
- Nimonkar, A. V. *et al.* BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes Dev.* **25**, 350–362 (2011).
- Nimonkar, A. V., Ozsoy, A. Z., Genschel, J., Modrich, P. & Kowalczykowski, S. C. Human exonuclease 1 and BLM helicase interact to resect DNA and initiate DNA repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 16906–16911 (2008).
- Nirodi, C. *et al.* A role for poly(ADP-ribose) polymerase in the transcriptional regulation of the melanoma growth stimulatory activity (CXCL1) gene expression. *J. Biol. Chem.* **276**, 9366–9374 (2001).
- Nishino, I., Spinazzola, A. & Hirano, M. Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science* **283**, 689–692 (1999).
- Noël, G., Giocanti, N., Fernet, M., Mégnin-Chanet, F. & Favaudon, V. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) is not involved in DNA double-strand break recovery. *BMC Cell Biol.* **4**, 7 (2003).
- Nordman, J. & Wright, A. The relationship between dNTP pool levels and mutagenesis in an Escherichia coli NDP kinase mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 10197–10202 (2008).
- Nousiainen, M., Silljé, H. H. W., Sauer, G., Nigg, E. A. & Körner, R. Phosphoproteome analysis of the human mitotic spindle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 5391–5396 (2006).
- Nygaard, P. On the role of cytidine deaminase in cellular metabolism. *Adv. Exp. Med. Biol.* **195** Pt B, 415–420 (1986).
- O'Sullivan, R. J. & Karlseder, J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 171–181 (2010).
- Oberoi, J. *et al.* Structural basis of poly(ADP-ribose) recognition by the multizinc binding domain of checkpoint with forkhead-associated and RING Domains (CHFR). *J. Biol. Chem.* **285**, 39348–39358 (2010).
- Ogino, H. *et al.* Loss of Parp-1 affects gene expression profile in a genome-wide manner in ES cells and liver cells. *BMC Genomics* **8**, 41 (2007).
- Ohanna, M. *et al.* Senescent cells develop a PARP-1 and nuclear factor- κ B-associated secretome (PNAS). *Genes Dev.* **25**, 1245–1261 (2011).
- Oka, S., Kato, J. & Moss, J. Identification and characterization of a mammalian 39-kDa poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *J. Biol. Chem.* **281**, 705–713 (2006).
- Ono, T., Kasamatsu, A., Oka, S. & Moss, J. The 39-kDa poly(ADP-ribose) glycohydrolase ARH3 hydrolyzes O-acetyl-ADP-ribose, a product of the Sir2 family of acetyl-histone deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 16687–16691 (2006).
- Opresko, P. L. *et al.* POT1 stimulates RecQ helicases WRN and BLM to unwind telomeric DNA substrates. *J. Biol. Chem.* **280**, 32069–32080 (2005).
- Opresko, P. L. *et al.* Telomere-binding protein TRF2 binds to and stimulates the Werner and Bloom syndrome helicases. *J. Biol. Chem.* **277**, 41110–41119 (2002).

- Opresko, P. L., Sowd, G. & Wang, H. The Werner syndrome helicase/exonuclease processes mobile D-loops through branch migration and degradation. *PLoS ONE* **4**, e4825 (2009).
- Orsburn, B. et al. Differential requirement for H2AX and 53BP1 in organismal development and genome maintenance in the absence of poly(ADP)ribosyl polymerase 1. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 2341–2352 (2010).
- Oshima, J. & Hisama, F. M. Search and insights into novel genetic alterations leading to classical and atypical Werner syndrome. *Gerontology* **60**, 239–246 (2014).
- Otterlei, M. et al. Werner syndrome protein participates in a complex with RAD51, RAD54, RAD54B and ATR in response to ICL-induced replication arrest. *J. Cell. Sci.* **119**, 5137–5146 (2006).
- Otto, H. et al. In silico characterization of the family of PARP-like poly(ADP-ribosyl)transferases (pARTs). *BMC Genomics* **6**, 139 (2005).
- Ouyang, K. J. et al. SUMO modification regulates BLM and RAD51 interaction at damaged replication forks. *PLoS Biol.* **7**, e1000252 (2009).
- Ouyang, K. J., Yagle, M. K., Matunis, M. J. & Ellis, N. A. BLM SUMOylation regulates ssDNA accumulation at stalled replication forks. *Front Genet* **4**, 167 (2013).
- Ozaki, Y. et al. Poly-ADP ribosylation of Miki by tankyrase-1 promotes centrosome maturation. *Mol. Cell* **47**, 694–706 (2012).
- Pacher, P. & Szabó, C. Role of poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in cardiovascular diseases: the therapeutic potential of PARP inhibitors. *Cardiovasc Drug Rev* **25**, 235–260 (2007).
- Paddock, M. N. et al. Competition between PARP-1 and Ku70 control the decision between high-fidelity and mutagenic DNA repair. *DNA Repair (Amst.)* **10**, 338–343 (2011).
- Palumbo, E., Matricardi, L., Tosoni, E., Bensimon, A. & Russo, A. Replication dynamics at common fragile site FRA6E. *Chromosoma* **119**, 575–587 (2010).
- Pan, M.-R. et al. Chromodomain helicase DNA-binding protein 4 (CHD4) regulates homologous recombination DNA repair, and its deficiency sensitizes cells to poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor treatment. *J. Biol. Chem.* **287**, 6764–6772 (2012).
- Papeo, G. et al. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition in cancer therapy: are we close to maturity? *Expert Opin Ther Pat* **19**, 1377–1400 (2009).
- Papin, J. A., Price, N. D., Wiback, S. J., Fell, D. A. & Palsson, B. O. Metabolic pathways in the post-genome era. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 250–258 (2003).
- Park, H., Francesconi, S. & Wang, T. S. Cell cycle expression of two replicative DNA polymerases alpha and delta from *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Biol. Cell* **4**, 145–157 (1993).
- Park, S.-J., Lee, Y.-J., Beck, B. D. & Lee, S.-H. A positive involvement of RecQL4 in UV-induced S-phase arrest. *DNA Cell Biol.* **25**, 696–703 (2006).
- Parkash, O. Thymidine teratogenesis and mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. *Experientia* **23**, 859–861 (1967).
- Parmar, S. et al. Variability in transport and biotransformation of cytarabine is associated with its toxicity in peripheral blood mononuclear cells. *Pharmacogenomics* **12**, 503–514 (2011).
- Parsons, J. L., Dianova, I. I., Allinson, S. L. & Dianov, G. L. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 protects excessive DNA strand breaks from deterioration during repair in human cell extracts. *FEBS J.* **272**, 2012–2021 (2005).
- Pastor-Anglada, M. & Pérez-Torras, S. Nucleoside transporter proteins as biomarkers of drug responsiveness and drug targets. *Front Pharmacol* **6**, 13 (2015).
- Patil, M., Pabla, N. & Dong, Z. Checkpoint kinase 1 in DNA damage response and cell cycle regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 4009–4021 (2013).
- Patro, B. S., Frøhlich, R., Bohr, V. A. & Stevnsner, T. WRN helicase regulates the ATR-Chk1-induced S-phase checkpoint pathway in response to topoisomerase-I-DNA covalent complexes. *J. Cell. Sci.* **124**, 3967–3979 (2011).
- Pavri, R. et al. PARP-1 determines specificity in a retinoid signaling pathway via direct modulation of mediator. *Mol. Cell* **18**, 83–96 (2005).
- Pedersen, R. T., Kruse, T., Nilsson, J., Oestergaard, V. H. & Lisby, M. TopBP1 is required at mitosis to reduce transmission of DNA damage to G1 daughter cells. *J. Cell Biol.* **210**, 565–582 (2015).
- Perrino, F. W., Mazur, D. J., Ward, H. & Harvey, S. Exonucleases and the incorporation of aryanucleotides into DNA. *Cell Biochem. Biophys.* **30**, 331–352 (1999).

- Perry, W. H. Methotrexate and teratogenesis. *Arch Dermatol* **119**, 874–875 (1983).
- Petermann, E. & Caldecott, K. W. Evidence that the ATR/Chk1 pathway maintains normal replication fork progression during unperturbed S phase. *Cell Cycle* **5**, 2203–2209 (2006).
- Petermann, E. & Helleday, T. Pathways of mammalian replication fork restart. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 683–687 (2010).
- Petes, S. J. & Lis, J. T. Rapid, transcription-independent loss of nucleosomes over a large chromatin domain at Hsp70 loci. *Cell* **134**, 74–84 (2008).
- Petsalaki, E., Dandoulaki, M., Morrice, N. & Zachos, G. Chk1 protects against chromatin bridges by constitutively phosphorylating BLM serine 502 to inhibit BLM degradation. *J. Cell. Sci.* **127**, 3902–3908 (2014).
- Phulwani, N. K. & Kielian, T. Poly (ADP-ribose) polymerases (PARPs) 1-3 regulate astrocyte activation. *J. Neurochem.* **106**, 578–590 (2008).
- Pichierri, P., Ammazalorso, F., Bignami, M. & Franchitto, A. The Werner syndrome protein: linking the replication checkpoint response to genome stability. *Aging (Albany NY)* **3**, 311–318 (2011).
- Pichierri, P., Franchitto, A. & Rosselli, F. BLM and the FANCD proteins collaborate in a common pathway in response to stalled replication forks. *EMBO J.* **23**, 3154–3163 (2004).
- Pleschke, J. M., Kleczkowska, H. E., Strohm, M. & Althaus, F. R. Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *J. Biol. Chem.* **275**, 40974–40980 (2000).
- Plohl, M., Meštrović, N. & Mravinac, B. Centromere identity from the DNA point of view. *Chromosoma* **123**, 313–325 (2014).
- Poirier, G. G., de Murcia, G., Jongstra-Bilen, J., Niedergang, C. & Mandel, P. Poly(ADP-ribosyl)ation of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 3423–3427 (1982).
- Poli, J. et al. dNTP pools determine fork progression and origin usage under replication stress. *EMBO J.* **31**, 883–894 (2012).
- Polo, S. E. Reshaping chromatin after DNA damage: the choreography of histone proteins. *J. Mol. Biol.* **427**, 626–636 (2015).
- Polo, S. E., Kaidi, A., Baskcomb, L., Galanty, Y. & Jackson, S. P. Regulation of DNA-damage responses and cell-cycle progression by the chromatin remodelling factor CHD4. *EMBO J.* **29**, 3130–3139 (2010).
- Pommier, Y., Zwelling, L. A., Kao-Shan, C. S., Whang-Peng, J. & Bradley, M. O. Correlations between intercalator-induced DNA strand breaks and sister chromatid exchanges, mutations, and cytotoxicity in Chinese hamster cells. *Cancer Res.* **45**, 3143–3149 (1985).
- Pontarin, G. et al. p53R2-dependent ribonucleotide reduction provides deoxyribonucleotides in quiescent human fibroblasts in the absence of induced DNA damage. *J. Biol. Chem.* **282**, 16820–16828 (2007).
- Pontarin, G. et al. Ribonucleotide reduction is a cytosolic process in mammalian cells independently of DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 17801–17806 (2008).
- Popoff, I. et al. Antisense oligonucleotides to poly(ADP-ribose) polymerase-2 ameliorate colitis in interleukin-10-deficient mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **303**, 1145–1154 (2002).
- Popuri, V., Tadokoro, T., Croteau, D. L. & Bohr, V. A. Human RECQL5: guarding the crossroads of DNA replication and transcription and providing backup capability. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **48**, 289–299 (2013).
- Porter, A. C. G. & Farr, C. J. Topoisomerase II: untangling its contribution at the centromere. *Chromosome Res.* **12**, 569–583 (2004).
- Poulo, J. M., Elston, T., Lane, A. N., Macdonald, J. M. and Cascante, M. (2012) Introduction to Metabolic Control Analysis. In: Fan, T. W.-M., Higashi, R. M. and Lane, A. N. (eds). *Handbook of Metabolomics*. Humana Press, NY.
- Prasad, B. & Unadkat, J. D. Optimized approaches for quantification of drug transporters in tissues and cells by MRM proteomics. *AAPS J.* **16**, 634–648 (2014).
- Prasad, R. et al. DNA polymerase beta-mediated long patch base excision repair. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 stimulates strand displacement DNA synthesis. *J. Biol. Chem.* **276**, 32411–32414 (2001).
- Prasad, R., Dyrkheeva, N., Williams, J. & Wilson, S. H. Mammalian Base Excision Repair: Functional Partnership between PARP-1 and APE1 in AP-Site Repair. *PLoS ONE* **10**, e0124269 (2015).
- Prem veer Reddy, G. & Pardee, A. B. Multienzyme complex for metabolic channeling in mammalian DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 3312–3316 (1980).
- Prevo, R. et al. The novel ATR inhibitor VE-821 increases sensitivity of pancreatic cancer cells to radiation and chemotherapy. *Cancer Biol. Ther.* **13**, 1072–1081 (2012).

- Pylyayeva-Gupta, Y., Grabocka, E. & Bar-Sagi, D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 761–774 (2011).
- Pyriochou, A., Olah, G., Deitch, E. A., Szabó, C. & Papapetropoulos, A. Inhibition of angiogenesis by the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor PJ-34. *Int. J. Mol. Med.* **22**, 113–118 (2008).
- Quénét, D. *et al.* The histone subcode: poly(ADP-ribose) polymerase-1 (Parp-1) and Parp-2 control cell differentiation by regulating the transcriptional intermediary factor TIF1beta and the heterochromatin protein HP1alpha. *FASEB J.* **22**, 3853–3865 (2008).
- Quiles-Perez, R. *et al.* Inhibition of poly adenosine diphosphate-ribose polymerase decreases hepatocellular carcinoma growth by modulation of tumor-related gene expression. *Hepatology* **51**, 255–266 (2010).
- Racz, B. *et al.* Regulation of MKP-1 expression and MAPK activation by PARP-1 in oxidative stress: a new mechanism for the cytoplasmic effect of PARP-1 activation. *Free Radic. Biol. Med.* **49**, 1978–1988 (2010).
- Radman, M. SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. *Basic Life Sci.* **5A**, 355–367 (1975).
- Radman, M., Taddei, F. & Matic, I. Evolution-driving genes. *Res. Microbiol.* **151**, 91–95 (2000).
- Rajamohan, S. B. *et al.* SIRT1 promotes cell survival under stress by deacetylation-dependent deactivation of poly(ADP-ribose) polymerase 1. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 4116–4129 (2009).
- Rajesh, M. *et al.* Poly(ADP-ribose)polymerase inhibition decreases angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **350**, 1056–1062 (2006).
- Ralf, C., Hickson, I. D. & Wu, L. The Bloom's syndrome helicase can promote the regression of a model replication fork. *J. Biol. Chem.* **281**, 22839–22846 (2006).
- Rampazzo, C. *et al.* Mitochondrial thymidine kinase and the enzymatic network regulating thymidine triphosphate pools in cultured human cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 34758–34769 (2007).
- Rampazzo, C. *et al.* Regulation by degradation, a cellular defense against deoxyribonucleotide pool imbalances. *Mutat. Res.* **703**, 2–10 (2010).
- Rao, V. A. *et al.* Endogenous gamma-H2AX-ATM-Chk2 checkpoint activation in Bloom's syndrome helicase deficient cells is related to DNA replication arrested forks. *Mol. Cancer Res.* **5**, 713–724 (2007).
- Rao, V. A. *et al.* Phosphorylation of BLM, dissociation from topoisomerase IIIalpha, and colocalization with gamma-H2AX after topoisomerase I-induced replication damage. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 8925–8937 (2005).
- Raval-Fernandes, S., Kickhoefer, V. A., Kitchen, C. & Rome, L. H. Increased susceptibility of vault poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice to carcinogen-induced tumorigenesis. *Cancer Res.* **65**, 8846–8852 (2005).
- Raynal, C. *et al.* High-resolution melting analysis of sequence variations in the cytidine deaminase gene (CDA) in patients with cancer treated with gemcitabine. *Ther Drug Monit* **32**, 53–60 (2010).
- Raynard, S. *et al.* Functional role of BLAP75 in BLM-topoisomerase IIIalpha-dependent holliday junction processing. *J. Biol. Chem.* **283**, 15701–15708 (2008).
- Reale, A., Matteis, G. D., Galleazzi, G., Zampieri, M. & Caiafa, P. Modulation of DNMT1 activity by ADP-ribose polymers. *Oncogene* **24**, 13–19 (2005).
- Reichard, P. Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 349–374 (1988).
- Reichard, P. Ribonucleotide reductases: substrate specificity by allostery. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **396**, 19–23 (2010).
- Reidy, J. A. Role of deoxyuridine incorporation and DNA repair in the expression of human chromosomal fragile sites. *Mutat. Res.* **200**, 215–220 (1988).
- Richard, D. J., Bolderson, E. & Khanna, K. K. Multiple human single-stranded DNA binding proteins function in genome maintenance: structural, biochemical and functional analysis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **44**, 98–116 (2009).
- Rieger, J., Durka, S., Streffer, J., Dichgans, J. & Weller, M. Gemcitabine cytotoxicity of human malignant glioma cells: modulation by antioxidants, BCL-2 and dexamethasone. *Eur. J. Pharmacol.* **365**, 301–308 (1999).
- Riffell, J. L., Lord, C. J. & Ashworth, A. Tankyrase-targeted therapeutics: expanding opportunities in the PARP family. *Nat Rev Drug Discov* **11**, 923–936 (2012).
- Rizzieri, D. *et al.* A phase II study of elacytarabine in combination with idarubicin and of human equilibrative nucleoside transporter 1 expression in patients with acute myeloid leukemia and persistent blasts after the first induction course. *Leuk. Lymphoma* **55**, 2114–2119 (2014).

- Robert, I., Dantzer, F. & Reina-San-Martin, B. Parp1 facilitates alternative NHEJ, whereas Parp2 suppresses IgH/c-myc translocations during immunoglobulin class switch recombination. *J. Exp. Med.* **206**, 1047–1056 (2009).
- Roberts, J. H., Stard, P., Giri, C. P. & Smulson, M. Cytoplasmic poly(ADP-ribose) polymerase during the HeLa cell cycle. *Arch. Biochem. Biophys.* **171**, 305–315 (1975).
- Rodríguez, M. I. *et al.* PARP-1 regulates metastatic melanoma through modulation of vimentin-induced malignant transformation. *PLoS Genet.* **9**, e1003531 (2013).
- Rongvaux, A., Andris, F., Van Gool, F. & Leo, O. Reconstructing eukaryotic NAD metabolism. *Bioessays* **25**, 683–690 (2003).
- Rosado, M. M., Bennici, E., Novelli, F. & Pioli, C. Beyond DNA repair, the immunological role of PARP-1 and its siblings. *Immunology* **139**, 428–437 (2013).
- Rosenthal, F. *et al.* Macrod domain-containing proteins are new mono-ADP-ribosylhydrolases. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 502–507 (2013).
- Rosidi, B. *et al.* Histone H1 functions as a stimulatory factor in backup pathways of NHEJ. *Nucleic Acids Res.* **36**, 1610–1623 (2008).
- Rosin, M. P. & German, J. Evidence for chromosome instability in vivo in Bloom syndrome: increased numbers of micronuclei in exfoliated cells. *Hum. Genet.* **71**, 187–191 (1985).
- Rossi, M. L., Ghosh, A. K., Kulikowicz, T., Croteau, D. L. & Bohr, V. A. Conserved helicase domain of human RecQ4 is required for strand annealing-independent DNA unwinding. *DNA Repair (Amst.)* **9**, 796–804 (2010).
- Rossmann, T. G. & Stone-Wolff, D. S. Inhibition of DNA synthesis is not sufficient to cause mutagenesis in Chinese hamster cells. *Biochimie* **64**, 809–813 (1982).
- Rouleau, M. *et al.* PARP-3 associates with polycomb group bodies and with components of the DNA damage repair machinery. *J. Cell. Biochem.* **100**, 385–401 (2007).
- Rouleau, M., Patel, A., Hendzel, M. J., Kaufmann, S. H. & Poirier, G. G. PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 293–301 (2010).
- Ruf, A., de Murcia, G. & Schulz, G. E. Inhibitor and NAD⁺ binding to poly(ADP-ribose) polymerase as derived from crystal structures and homology modeling. *Biochemistry* **37**, 3893–3900 (1998).
- Ruf, A., Mennissier de Murcia, J., de Murcia, G. & Schulz, G. E. Structure of the catalytic fragment of poly(AD-ribose) polymerase from chicken. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 7481–7485 (1996).
- Ruf, A., Rolli, V., de Murcia, G. & Schulz, G. E. The mechanism of the elongation and branching reaction of poly(ADP-ribose) polymerase as derived from crystal structures and mutagenesis. *J. Mol. Biol.* **278**, 57–65 (1998).
- Rulten, S. L. *et al.* PARP-3 and APLF function together to accelerate nonhomologous end-joining. *Mol. Cell* **41**, 33–45 (2011).
- Ruscetti, T. *et al.* Stimulation of the DNA-dependent protein kinase by poly(ADP-ribose) polymerase. *J. Biol. Chem.* **273**, 14461–14467 (1998).
- Russell, B. *et al.* Chromosome breakage is regulated by the interaction of the BLM helicase and topoisomerase IIα. *Cancer Res.* **71**, 561–571 (2011).
- Saintigny, Y. *et al.* Characterization of homologous recombination induced by replication inhibition in mammalian cells. *EMBO J.* **20**, 3861–3870 (2001).
- Sakamoto, A. *et al.* Quantitative expression of human drug transporter proteins in lung tissues: analysis of regional, gender, and interindividual differences by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Sci.* **102**, 3395–3406 (2013).
- Saldivar, J. C. *et al.* Initiation of genome instability and preneoplastic processes through loss of Fhit expression. *PLoS Genet.* **8**, e1003077 (2012).
- Sampath, D., Zabka, T. S., Misner, D. L., O'Brien, T. & Dragovich, P. S. Inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) as a therapeutic strategy in cancer. *Pharmacol. Ther.* **151**, 16–31 (2015).
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Unsal-Kaçmaz, K. & Linn, S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 39–85 (2004).
- Sánchez, A. *et al.* Replication fork collapse and genome instability in a deoxycytidylate deaminase mutant. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 4445–4454 (2012).
- Sandler, A. & Ettinger, D. S. Gemcitabine: single-agent and combination therapy in non-small cell lung cancer. *Oncologist* **4**, 241–251 (1999).

- Sanz, M. M., Proytcheva, M., Ellis, N. A., Holloman, W. K. & German, J. BLM, the Bloom's syndrome protein, varies during the cell cycle in its amount, distribution, and co-localization with other nuclear proteins. *Cytogenet. Cell Genet.* **91**, 217–223 (2000).
- Sartori, A. A. *et al.* Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* **450**, 509–514 (2007).
- Saxena, A. *et al.* Poly(ADP-ribose) polymerase 2 localizes to mammalian active centromeres and interacts with PARP-1, Cenpa, Cenpb and Bub3, but not Cenpc. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 2319–2329 (2002).
- Sbodio, J. I., Lodish, H. F. & Chi, N.-W. Tankyrase-2 oligomerizes with tankyrase-1 and binds to both TRF1 (telomere-repeat-binding factor 1) and IRAP (insulin-responsive aminopeptidase). *Biochem. J.* **361**, 451–459 (2002).
- Scarpa, E. S., Fabrizio, G. & Di Girolamo, M. A role of intracellular mono-ADP-ribosylation in cancer biology. *FEBS J.* **280**, 3551–3562 (2013).
- Schaaper, R. M. & Mathews, C. K. Mutational consequences of dNTP pool imbalances in *E. Coli*. *DNA Repair (Amst.)* **12**, 73–79 (2013).
- Schiewer, M. J. *et al.* Dual roles of PARP-1 promote cancer growth and progression. *Cancer Discov* **2**, 1134–1149 (2012).
- Schreiber, V. *et al.* Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *J. Biol. Chem.* **277**, 23028–23036 (2002).
- Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J.-C. & de Murcia, G. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 517–528 (2006).
- Schreiber, V., Molinete, M., Boeuf, H., de Murcia, G. & Ménissier-de Murcia, J. The human poly(ADP-ribose) polymerase nuclear localization signal is a bipartite element functionally separate from DNA binding and catalytic activity. *EMBO J.* **11**, 3263–3269 (1992).
- Schröder-Heurich, B., Wieland, B., Lavin, M. F., Schindler, D. & Dörk, T. Protective role of RAD50 on chromatin bridges during abnormal cytokinesis. *FASEB J.* **28**, 1331–1341 (2014).
- Schueler, M. G. & Sullivan, B. A. Structural and functional dynamics of human centromeric chromatin. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **7**, 301–313 (2006).
- Schüller, J. *et al.* Preferential activation of capecitabine in tumor following oral administration to colorectal cancer patients. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **45**, 291–297 (2000).
- Schultz, N., Lopez, E., Saleh-Gohari, N. & Helleday, T. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) has a controlling role in homologous recombination. *Nucleic Acids Res.* **31**, 4959–4964 (2003).
- Schulz, V. P. *et al.* Accelerated loss of telomeric repeats may not explain accelerated replicative decline of Werner syndrome cells. *Hum. Genet.* **97**, 750–754 (1996).
- Schweiger, M. *et al.* Characterization of recombinant human nicotinamide mononucleotide adenylyl transferase (NMNAT), a nuclear enzyme essential for NAD synthesis. *FEBS Lett.* **492**, 95–100 (2001).
- Schwendener, S. *et al.* Physical interaction of RECQ5 helicase with RAD51 facilitates its anti-recombinase activity. *J. Biol. Chem.* **285**, 15739–15745 (2010).
- Scott, C. L., Swisher, E. M. & Kaufmann, S. H. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors: recent advances and future development. *J. Clin. Oncol.* **33**, 1397–1406 (2015).
- Seco-Cervera, M. *et al.* Oxidative stress and antioxidant response in fibroblasts from Werner and atypical Werner syndromes. *Aging (Albany NY)* **6**, 231–245 (2014).
- Segurado, M. & Tercero, J. A. The S-phase checkpoint: targeting the replication fork. *Biol. Cell* **101**, 617–627 (2009).
- Sengupta, S. *et al.* Functional interaction between BLM helicase and 53BP1 in a Chk1-mediated pathway during S-phase arrest. *J. Cell Biol.* **166**, 801–813 (2004).
- Serdjebi, C. *et al.* Rapid deaminator status is associated with poor clinical outcome in pancreatic cancer patients treated with a gemcitabine-based regimen. *Pharmacogenomics* **14**, 1047–1051 (2013).
- Serdjebi, C. *et al.* Recipient/donor contradictory genotypes with impact on drug pharmacogenetics after liver transplant: a deadly gift? *Pharmacogenet. Genomics* **24**, 527–529 (2014).
- Serdjebi, C., Milano, G. & Ciccolini, J. Role of cytidine deaminase in toxicity and efficacy of nucleosidic analogs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **11**, 665–672 (2015).
- Sfeir, A. *et al.* Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication. *Cell* **138**, 90–103 (2009).

- Sharifi, R. *et al.* Deficiency of terminal ADP-ribose protein glycohydrolase TARG1/C6orf130 in neurodegenerative disease. *EMBO J.* **32**, 1225–1237 (2013).
- Shelley, M. D. *et al.* Intravesical gemcitabine therapy for non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC): a systematic review. *BJU Int.* **109**, 496–505 (2012).
- Shen, Y., Aoyagi-Scharber, M. & Wang, B. Trapping Poly(ADP-Ribose) Polymerase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **353**, 446–457 (2015).
- Sherley, J. L. & Kelly, T. J. Regulation of human thymidine kinase during the cell cycle. *J. Biol. Chem.* **263**, 8350–8358 (1988).
- Shevalye, H. *et al.* Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibition counteracts multiple manifestations of kidney disease in long-term streptozotocin-diabetic rat model. *Biochem. Pharmacol.* **79**, 1007–1014 (2010).
- Shimuta, K. *et al.* Chk1 is activated transiently and targets Cdc25A for degradation at the *Xenopus* midblastula transition. *EMBO J.* **21**, 3694–3703 (2002).
- Sidorova, J. M., Kehrli, K., Mao, F. & Monnat, R. Distinct functions of human RECQ helicases WRN and BLM in replication fork recovery and progression after hydroxyurea-induced stalling. *DNA Repair (Amst.)* **12**, 128–139 (2013).
- Sidorova, J. M., Li, N., Folch, A. & Monnat, R. J. The RecQ helicase WRN is required for normal replication fork progression after DNA damage or replication fork arrest. *Cell Cycle* **7**, 796–807 (2008).
- Siitonen, H. A. *et al.* Molecular defect of RAPADILINO syndrome expands the phenotype spectrum of RECQL diseases. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 2837–2844 (2003).
- Siitonen, H. A. *et al.* The mutation spectrum in RECQL4 diseases. *Eur. J. Hum. Genet.* **17**, 151–158 (2009).
- Simbulan-Rosenthal, C. M., Rosenthal, D. S., Iyer, S., Boulares, A. H. & Smulson, M. E. Transient poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins and role of poly(ADP-ribose) polymerase in the early stages of apoptosis. *J. Biol. Chem.* **273**, 13703–13712 (1998).
- Simbulan-Rosenthal, C. M. *et al.* PARP-1 binds E2F-1 independently of its DNA binding and catalytic domains, and acts as a novel coactivator of E2F-1-mediated transcription during re-entry of quiescent cells into S phase. *Oncogene* **22**, 8460–8471 (2003).
- Singh, D. K. *et al.* The involvement of human RECQL4 in DNA double-strand break repair. *Aging Cell* **9**, 358–371 (2010).
- Singh, T. R. *et al.* BLAP18/RMI2, a novel OB-fold-containing protein, is an essential component of the Bloom helicase-double Holliday junction dissolvase. *Genes Dev.* **22**, 2856–2868 (2008).
- Slade, D. *et al.* The structure and catalytic mechanism of a poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Nature* **477**, 616–620 (2011).
- Slansky, J. E., Li, Y., Kaelin, W. G. & Farnham, P. J. A protein synthesis-dependent increase in E2F1 mRNA correlates with growth regulation of the dihydrofolate reductase promoter. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 1610–1618 (1993).
- Slupphaug, G., Kavli, B. & Krokan, H. E. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat. Res.* **531**, 231–251 (2003).
- Smeenk, G. *et al.* Poly(ADP-ribosyl)ation links the chromatin remodeler SMARCA5/SNF2H to RNF168-dependent DNA damage signaling. *J. Cell. Sci.* **126**, 889–903 (2013).
- Smith, S. & de Lange, T. Tankyrase promotes telomere elongation in human cells. *Curr. Biol.* **10**, 1299–1302 (2000).
- Smith, S., Gariat, I., Schmitt, A. & de Lange, T. Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* **282**, 1484–1487 (1998).
- Smits, V. A. J. & Gillespie, D. A. DNA damage control: regulation and functions of checkpoint kinase 1. *FEBS J.* (2015). doi:[10.1111/febs.13387](https://doi.org/10.1111/febs.13387)
- Sofueva, S. *et al.* Ultrafine anaphase bridges, broken DNA and illegitimate recombination induced by a replication fork barrier. *Nucleic Acids Res.* **39**, 6568–6584 (2011).
- Soldani, C. & Scovassi, A. I. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis* **7**, 321–328 (2002).
- Somasekaram, A., Jarmuz, A., How, A., Scott, J. & Navaratnam, N. Intracellular localization of human cytidine deaminase. Identification of a functional nuclear localization signal. *J. Biol. Chem.* **274**, 28405–28412 (1999).
- Sonoda, E. *et al.* Scc1/Rad21/Mcd1 is required for sister chromatid cohesion and kinetochore function in vertebrate cells. *Dev. Cell* **1**, 759–770 (2001).
- Soo, R. A. *et al.* Distribution of gemcitabine pathway genotypes in ethnic Asians and their association with outcome in non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* **63**, 121–127 (2009).

- Sørensen, C. S. *et al.* Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell* **3**, 247–258 (2003).
- Southan, G. J. & Szabó, C. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **10**, 321–340 (2003).
- Spagnolo, L., Barbeau, J., Curtin, N. J., Morris, E. P. & Pearl, L. H. Visualization of a DNA-PK/PARP1 complex. *Nucleic Acids Res* **40**, 4168–4177 (2012).
- Spratlin, J. *et al.* The absence of human equilibrative nucleoside transporter 1 is associated with reduced survival in patients with gemcitabine-treated pancreas adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* **10**, 6956–6961 (2004).
- Sridharan, V., Park, H., Ryu, H. & Azuma, Y. SUMOylation regulates polo-like kinase 1-interacting checkpoint helicase (PICH) during mitosis. *J. Biol. Chem.* **290**, 3269–3276 (2015).
- Stavnezer, J., Guikema, J. E. J. & Schrader, C. E. Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 261–292 (2008).
- Stavropoulos, D. J. *et al.* The Bloom syndrome helicase BLM interacts with TRF2 in ALT cells and promotes telomeric DNA synthesis. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 3135–3144 (2002).
- Steigemann, P. *et al.* Aurora B-mediated abscission checkpoint protects against tetraploidization. *Cell* **136**, 473–484 (2009).
- Stewart, D. J. Wnt signaling pathway in non-small cell lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **106**, djt356 (2014).
- Stilmann, M. *et al.* A nuclear poly(ADP-ribose)-dependent signalosome confers DNA damage-induced I κ B kinase activation. *Mol. Cell* **36**, 365–378 (2009).
- Stone, R. M. Treatment of acute myeloid leukemia: state-of-the-art and future directions. *Semin. Hematol.* **39**, 4–10 (2002).
- Ström, C. E. & Helleday, T. Strategies for the Use of Poly(adenosine diphosphate ribose) Polymerase (PARP) Inhibitors in Cancer Therapy. *Biomolecules* **2**, 635–649 (2012).
- Sturzenegger, A. *et al.* DNA2 cooperates with the WRN and BLM RecQ helicases to mediate long-range DNA end resection in human cells. *J. Biol. Chem.* **289**, 27314–27326 (2014).
- Subramaniam, D., Thombre, R., Dhar, A. & Anant, S. DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. *Front Oncol* **4**, 80 (2014).
- Sugimura, K., Takebayashi, S., Taguchi, H., Takeda, S. & Okumura, K. PARP-1 ensures regulation of replication fork progression by homologous recombination on damaged DNA. *J Cell Biol* **183**, 1203–1212 (2008).
- Sugiyama, E. *et al.* Pharmacokinetics of gemcitabine in Japanese cancer patients: the impact of a cytidine deaminase polymorphism. *J. Clin. Oncol.* **25**, 32–42 (2007).
- Sun, H., Karow, J. K., Hickson, I. D. & Maizels, N. The Bloom's syndrome helicase unwinds G4 DNA. *J. Biol. Chem.* **273**, 27587–27592 (1998).
- Sutherland, G. R. & Baker, E. Effects of nucleotides on expression of the folate sensitive fragile sites. *Am. J. Med. Genet.* **23**, 409–417 (1986).
- Sutherland, G. R. The role of nucleotides in human fragile site expression. *Mutat. Res.* **200**, 207–213 (1988).
- Sutherland, G. R., Baker, E. & Fratini, A. Excess thymidine induces folate sensitive fragile sites. *Am. J. Med. Genet.* **22**, 433–443 (1985).
- Sutherland, G. R., Jacky, P. B., Baker, E. & Manuel, A. Heritable fragile sites on human chromosomes. X. New folate-sensitive fragile sites: 6p23, 9p21, 9q32, and 11q23. *Am. J. Hum. Genet.* **35**, 432–437 (1983).
- Swan, M. K. *et al.* Structure of human Bloom's syndrome helicase in complex with ADP and duplex DNA. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **70**, 1465–1475 (2014).
- Szanto, A. *et al.* PARP-1 inhibition-induced activation of PI-3-kinase-Akt pathway promotes resistance to taxol. *Biochem. Pharmacol.* **77**, 1348–1357 (2009).
- Szántó, M. *et al.* Poly(ADP-ribose) polymerase-2: emerging transcriptional roles of a DNA-repair protein. *Cell. Mol. Life Sci.* **69**, 4079–4092 (2012).
- Szczesny, B., Brunyanski, A., Olah, G., Mitra, S. & Szabo, C. Opposing roles of mitochondrial and nuclear PARP1 in the regulation of mitochondrial and nuclear DNA integrity: implications for the regulation of mitochondrial function. *Nucleic Acids Res.* **42**, 13161–13173 (2014).
- Tallis, M., Morra, R., Barkauskaite, E. & Ahel, I. Poly(ADP-ribosyl)ation in regulation of chromatin structure and the DNA damage response. *Chromosoma* **123**, 79–90 (2014).

- Tanaka, H. et al. A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* **404**, 42–49 (2000).
- Telli, M. L. PARP inhibitors in cancer: moving beyond BRCA. *Lancet Oncol.* **12**, 827–828 (2011).
- Tentori, L. et al. Stable depletion of poly (ADP-ribose) polymerase-1 reduces in vivo melanoma growth and increases chemosensitivity. *Eur. J. Cancer* **44**, 1302–1314 (2008).
- Terasawa, M., Shinohara, A. & Shinohara, M. Canonical non-homologous end joining in mitosis induces genome instability and is suppressed by M-phase-specific phosphorylation of XRCC4. *PLoS Genet.* **10**, e1004563 (2014).
- Tibaldi, C. et al. Correlation of cytidine deaminase polymorphisms and activity with clinical outcome in gemcitabine-/platinum-treated advanced non-small-cell lung cancer patients. *Ann. Oncol.* **23**, 670–677 (2012).
- Tikoo, S. et al. Ubiquitin-dependent recruitment of the Bloom syndrome helicase upon replication stress is required to suppress homologous recombination. *EMBO J.* **32**, 1778–1792 (2013).
- Timinszky, G. et al. A macrodomain-containing histone rearranges chromatin upon sensing PARP1 activation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 923–929 (2009).
- Tommerup, N., Poulsen, H. & Brøndum-Nielsen, K. 5-Fluoro-2'-deoxyuridine induction of the fragile site on Xq28 associated with X linked mental retardation. *J. Med. Genet.* **18**, 374–376 (1981).
- Tong, W. M. et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 plays a role in suppressing mammary tumorigenesis in mice. *Oncogene* **26**, 3857–3867 (2007).
- Trucco, C., Oliver, F. J., de Murcia, G. & Ménissier-de Murcia, J. DNA repair defect in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient cell lines. *Nucleic Acids Res.* **26**, 2644–2649 (1998).
- Tse, A. N. et al. CHIR-124, a novel potent inhibitor of Chk1, potentiates the cytotoxicity of topoisomerase I poisons in vitro and in vivo. *Clin. Cancer Res.* **13**, 591–602 (2007).
- Tulin, A. & Spradling, A. Chromatin loosening by poly(ADP)-ribose polymerase (PARP) at *Drosophila* puff loci. *Science* **299**, 560–562 (2003).
- Tuncel, H. et al. PARP6, a mono(ADP-ribosyl) transferase and a negative regulator of cell proliferation, is involved in colorectal cancer development. *Int. J. Oncol.* **41**, 2079–2086 (2012).
- Turley, H., Wu, L., Canamero, M., Gatter, K. C. & Hickson, I. D. The distribution and expression of the Bloom's syndrome gene product in normal and neoplastic human cells. *Br. J. Cancer* **85**, 261–265 (2001).
- Ueno, H. et al. Homozygous CDA*3 is a major cause of life-threatening toxicities in gemcitabine-treated Japanese cancer patients. *Br. J. Cancer* **100**, 870–873 (2009).
- Uhlín, U. & Eklund, H. Structure of ribonucleotide reductase protein R1. *Nature* **370**, 533–539 (1994).
- Uhlmann, F., Wernic, D., Poupart, M. A., Koonin, E. V. & Nasmyth, K. Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell* **103**, 375–386 (2000).
- Umezū, K., Nakayama, K. & Nakayama, H. Escherichia coli RecQ protein is a DNA helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 5363–5367 (1990).
- Underhill, C., Toulmonde, M. & Bonnefoi, H. A review of PARP inhibitors: from bench to bedside. *Ann. Oncol.* **22**, 268–279 (2011).
- Valerie, K. & Povirk, L. F. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene* **22**, 5792–5812 (2003).
- Van Brabant, A. J., Stan, R. & Ellis, N. A. DNA helicases, genomic instability, and human genetic disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **1**, 409–459 (2000).
- Van Gennip AH (1999) Defects in metabolism of purines and pyrimidines. *Ned Tijdsch Klin Chem* **24**: 171–175.
- Van Gennip AH, Bierau J, Nyhan WL (2006) Inborn errors of purine and pyrimidine metabolism. In: Blau N, Hoffman G, Leonard J, eds. *Physician's Guide to the Treatment and Follow-up of Metabolic Diseases*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 245–255.
- Van Kuilenburg, A. B., Meinsma, R., Vreken, P., Waterham, H. R. & van Gennip, A. H. Identification of a cDNA encoding an isoform of human CTP synthetase. *Biochim. Biophys. Acta* **1492**, 548–552 (2000).
- Van Maldergem, L. et al. Revisiting the craniosynostosis-radial ray hypoplasia association: Baller-Gerold syndrome caused by mutations in the RECQL4 gene. *J. Med. Genet.* **43**, 148–152 (2006).

- Venkannagari, H., Fallarero, A., Feijs, K. L. H., Lüscher, B. & Lehtiö, L. Activity-based assay for human mono-ADP-ribosyltransferases ARTD7/PARP15 and ARTD10/PARP10 aimed at screening and profiling inhibitors. *Eur J Pharm Sci* **49**, 148–156 (2013).
- Veuger, S. J., Hunter, J. E. & Durkacz, B. W. Ionizing radiation-induced NF-kappaB activation requires PARP-1 function to confer radioresistance. *Oncogene* **28**, 832–842 (2009).
- Vilpo, J. A. & Vilpo, L. M. Nucleoside monophosphate kinase may be the key enzyme preventing salvage of DNA 5-methylcytosine. *Mutat. Res.* **286**, 217–220 (1993).
- Vincenzetti, S. *et al.* Functional properties of subunit interactions in human cytidine deaminase. *Protein Eng.* **16**, 1055–1061 (2003).
- Vincenzetti, S. *et al.* Human placenta cytidine deaminase: a zinc metalloprotein. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **42**, 469–476 (1997).
- Vincenzetti, S. *et al.* Isoenzymatic forms of human cytidine deaminase. *Protein Eng. Des. Sel.* **17**, 871–877 (2004).
- Vincenzetti, S. *et al.* Modulation of human cytidine deaminase by specific aminoacids involved in the intersubunit interactions. *Proteins* **70**, 144–156 (2008).
- Vincenzetti, S. *et al.* Possible role of two phenylalanine residues in the active site of human cytidine deaminase. *Protein Eng.* **13**, 791–799 (2000).
- Vincenzetti, S., Cambi, A., Neuhard, J., Garattini, E. & Vita, A. Recombinant human cytidine deaminase: expression, purification, and characterization. *Protein Expr. Purif.* **8**, 247–253 (1996).
- Vinciguerra, P., Godinho, S. A., Parmar, K., Pellman, D. & Andrea, A. D. D'. Cytokinesis failure occurs in Fanconi anemia pathway-deficient murine and human bone marrow hematopoietic cells. *J. Clin. Invest.* **120**, 3834–3842 (2010).
- Vindigni, A. & Hickson, I. D. RecQ helicases: multiple structures for multiple functions? *HFSP J* **3**, 153–164 (2009).
- Vindigni, A., Marino, F. & Gileadi, O. Probing the structural basis of RecQ helicase function. *Biophys. Chem.* **149**, 67–77 (2010).
- Virág, L. & Szabó, C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol. Rev.* **54**, 375–429 (2002).
- Virsik-Köpp, P., Rave-Fränk, M., Hofman-Hüther, H. & Schmidberger, H. Role of DNA-PK in the process of aberration formation as studied in irradiated human glioblastoma cell lines M059K and M059J. *Int. J. Radiat. Biol.* **79**, 61–68 (2003).
- Wacker, D. A. *et al.* The DNA binding and catalytic domains of poly(ADP-ribose) polymerase 1 cooperate in the regulation of chromatin structure and transcription. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 7475–7485 (2007).
- Wahlberg, E. *et al.* Family-wide chemical profiling and structural analysis of PARP and tankyrase inhibitors. *Nat. Biotechnol.* **30**, 283–288 (2012).
- Waizenegger, I. C., Hauf, S., Meinke, A. & Peters, J. M. Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell* **103**, 399–410 (2000).
- Walker, G. C. SOS-regulated proteins in translesion DNA synthesis and mutagenesis. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 416–420 (1995).
- Wang, H., Zhang, X., Teng, L. & Legerski, R. J. DNA damage checkpoint recovery and cancer development. *Exp. Cell Res.* **334**, 350–358 (2015).
- Wang, J. C. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 430–440 (2002).
- Wang, J., Chen, J. & Gong, Z. TopBP1 controls BLM protein level to maintain genome stability. *Mol. Cell* **52**, 667–678 (2013).
- Wang, L. & Weiss, B. dcd (dCTP deaminase) gene of *Escherichia coli*: mapping, cloning, sequencing, and identification as a locus of suppressors of lethal dut (dUTPase) mutations. *J. Bacteriol.* **174**, 5647–5653 (1992).
- Wang, L. H.-C., Mayer, B., Stemmann, O. & Nigg, E. A. Centromere DNA decatenation depends on cohesin removal and is required for mammalian cell division. *J. Cell. Sci.* **123**, 806–813 (2010).
- Wang, L. *et al.* Allele-specific late replication and fragility of the most active common fragile site, FRA3B. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 431–437 (1999).
- Wang, M. *et al.* PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res.* **34**, 6170–6182 (2006).
- Wang, T., Simbulan-Rosenthal, C. M., Smulson, M. E., Chock, P. B. & Yang, D. C. H. Polyubiquitylation of PARP-1 through ubiquitin K48 is modulated by activated DNA, NAD⁺, and dipeptides. *J. Cell. Biochem.* **104**, 318–328 (2008).

- Wang, Y. *et al.* Poly(ADP-ribose) (PAR) binding to apoptosis-inducing factor is critical for PAR polymerase-1-dependent cell death (parthanatos). *Sci Signal* **4**, ra20 (2011).
- Wang, Z. *et al.* Recognition of the iso-ADP-ribose moiety in poly(ADP-ribose) by WWE domains suggests a general mechanism for poly(ADP-ribosyl)ation-dependent ubiquitination. *Genes Dev.* **26**, 235–240 (2012).
- Warren, S. T., Schultz, R. A., Chang, C. C., Wade, M. H. & Trosko, J. E. Elevated spontaneous mutation rate in Bloom syndrome fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 3133–3137 (1981).
- Waseem, N. H., Labib, K., Nurse, P. & Lane, D. P. Isolation and analysis of the fission yeast gene encoding polymerase delta accessory protein PCNA. *EMBO J.* **11**, 5111–5120 (1992).
- Watanabe, S. & Uchida, T. Expression of cytidine deaminase in human solid tumors and its regulation by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Biochim. Biophys. Acta* **1312**, 99–104 (1996).
- Watanabe, Y., Kazuki, Y., Oshimura, M., Ikemura, T. & Maekawa, M. Replication timing in a single human chromosome 11 transferred into the Chinese hamster ovary (CHO) cell line. *Gene* **510**, 1–6 (2012).
- Weaver, A. N. & Yang, E. S. Beyond DNA Repair: Additional Functions of PARP-1 in Cancer. *Front Oncol* **3**, 290 (2013).
- Weinberg, G. L., Ullman, B., Wright, C. M. & Martin, D. W. The effects of exogenous thymidine on endogenous deoxynucleotides and mutagenesis in mammalian cells. *Somat. Cell Mol. Genet.* **11**, 413–419 (1985).
- Weinberg, G., Ullman, B. & Martin, D. W. Mutator phenotypes in mammalian cell mutants with distinct biochemical defects and abnormal deoxyribonucleoside triphosphate pools. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 2447–2451 (1981).
- Weinstock, D. M., Richardson, C. A., Elliott, B. & Jasin, M. Modeling oncogenic translocations: distinct roles for double-strand break repair pathways in translocation formation in mammalian cells. *DNA Repair (Amst.)* **5**, 1065–1074 (2006).
- Wesierska-Gadek, J., Ranftler, C. & Schmid, G. Physiological ageing: role of p53 and PARP-1 tumor suppressors in the regulation of terminal senescence. *J. Physiol. Pharmacol.* **56 Suppl 2**, 77–88 (2005).
- Wheeler, L. J., Rajagopal, I. & Mathews, C. K. Stimulation of mutagenesis by proportional deoxyribonucleoside triphosphate accumulation in *Escherichia coli*. *DNA Repair (Amst.)* **4**, 1450–1456 (2005).
- White, J. H., Barker, D. G., Nurse, P. & Johnston, L. H. Periodic transcription as a means of regulating gene expression during the cell cycle: contrasting modes of expression of DNA ligase genes in budding and fission yeast. *EMBO J.* **5**, 1705–1709 (1986).
- Wiederhold, L. *et al.* AP endonuclease-independent DNA base excision repair in human cells. *Mol. Cell* **15**, 209–220 (2004).
- Wilhelm, T. *et al.* Spontaneous slow replication fork progression elicits mitosis alterations in homologous recombination-deficient mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 763–768 (2014).
- Wilkinson, Y. A. & McKenna, P. G. The effects of thymidine on deoxyribonucleotide pool levels, cytotoxicity and mutation induction in Friend mouse erythroleukaemia cells. *Leuk. Res.* **13**, 615–620 (1989).
- Williams, G. J. *et al.* Structural insights into NHEJ: building up an integrated picture of the dynamic DSB repair super complex, one component and interaction at a time. *DNA Repair (Amst.)* **17**, 110–120 (2014).
- Wilson, D. M. & Thompson, L. H. Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. *Mutat. Res.* **616**, 11–23 (2007).
- Witcher, M. & Emerson, B. M. Epigenetic silencing of the p16(INK4a) tumor suppressor is associated with loss of CTCF binding and a chromatin boundary. *Mol. Cell* **34**, 271–284 (2009).
- Witkin, E. M., McCall, J. O., Volkert, M. R. & Wermundsen, I. E. Constitutive expression of SOS functions and modulation of mutagenesis resulting from resolution of genetic instability at or near the *recA* locus of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **185**, 43–50 (1982).
- Wright, R. H. G. *et al.* CDK2-dependent activation of PARP-1 is required for hormonal gene regulation in breast cancer cells. *Genes Dev.* **26**, 1972–1983 (2012).
- Wu, L. & Hickson, I. D. The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature* **426**, 870–874 (2003).
- Wu, L. *et al.* BLAP75/RMI1 promotes the BLM-dependent dissolution of homologous recombination intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 4068–4073 (2006).
- Wu, L., Davies, S. L., Levitt, N. C. & Hickson, I. D. Potential role for the BLM helicase in recombinational repair via a conserved interaction with RAD51. *J. Biol. Chem.* **276**, 19375–19381 (2001).
- Xiao, Z. *et al.* Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents. *J. Biol. Chem.* **278**, 21767–21773 (2003).

- Xie, M. et al. Bcl2 induces DNA replication stress by inhibiting ribonucleotide reductase. *Cancer Res.* **74**, 212–223 (2014).
- Xu, D. et al. RMI, a new OB-fold complex essential for Bloom syndrome protein to maintain genome stability. *Genes Dev.* **22**, 2843–2855 (2008).
- Xu, J. et al. High incidence of severe neutropenia after gemcitabine-based chemotherapy in Chinese cancer patients with CDA 79A>C mutation. *Clin. Chim. Acta* **413**, 1284–1287 (2012).
- Yan, Q. et al. BAL1 and its partner E3 ligase, BBAP, link Poly(ADP-ribose) activation, ubiquitylation, and double-strand DNA repair independent of ATM, MDC1, and RNF8. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 845–857 (2013).
- Yang, F., Baumann, C. & La Fuente, R. De. Persistence of histone H2AX phosphorylation after meiotic chromosome synapsis and abnormal centromere cohesion in poly (ADP-ribose) polymerase (Parp-1) null oocytes. *Dev. Biol.* **331**, 326–338 (2009).
- Yang, J., Bachrati, C. Z., Ou, J., Hickson, I. D. & Brown, G. W. Human topoisomerase IIIalpha is a single-stranded DNA decatenase that is stimulated by BLM and RMI1. *J. Biol. Chem.* **285**, 21426–21436 (2010).
- Yang, W. Topoisomerases and site-specific recombinases: similarities in structure and mechanism. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **45**, 520–534 (2010).
- Yang, Y.-G., Cortes, U., Patnaik, S., Jasin, M. & Wang, Z.-Q. Ablation of PARP-1 does not interfere with the repair of DNA double-strand breaks, but compromises the reactivation of stalled replication forks. *Oncogene* **23**, 3872–3882 (2004).
- Yankiwski, V., Marciniak, R. A., Guarente, L. & Neff, N. F. Nuclear structure in normal and Bloom syndrome cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 5214–5219 (2000).
- Yankiwski, V., Noonan, J. P. & Neff, N. F. The C-terminal domain of the Bloom syndrome DNA helicase is essential for genomic stability. *BMC Cell Biol.* **2**, 11 (2001).
- Yao, N. Y., Schroeder, J. W., Yurieva, O., Simmons, L. A. & O'Donnell, M. E. Cost of rNTP/dNTP pool imbalance at the replication fork. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 12942–12947 (2013).
- Yardley, D. A. Gemcitabine and taxanes as a new standard of care in breast cancer. *Clin. Breast Cancer* **4 Suppl 3**, S107–112 (2004).
- Ye, F.-G. et al. Cytidine Deaminase Axis Modulated by miR-484 Differentially Regulates Cell Proliferation and Chemoresistance in Breast Cancer. *Cancer Res.* **75**, 1504–1515 (2015).
- Yélamos, J., Schreiber, V. & Dantzer, F. Toward specific functions of poly(ADP-ribose) polymerase-2. *Trends Mol Med* **14**, 169–178 (2008).
- Yin, J. et al. BLAP75, an essential component of Bloom's syndrome protein complexes that maintain genome integrity. *EMBO J.* **24**, 1465–1476 (2005).
- Ying, S. et al. MUS81 promotes common fragile site expression. *Nat. Cell Biol.* **15**, 1001–1007 (2013).
- Ying, S., Hamdy, F. C. & Helleday, T. Mre11-dependent degradation of stalled DNA replication forks is prevented by BRCA2 and PARP1. *Cancer Res.* **72**, 2814–2821 (2012).
- Yu, M. et al. PARP-10, a novel Myc-interacting protein with poly(ADP-ribose) polymerase activity, inhibits transformation. *Oncogene* **24**, 1982–1993 (2005).
- Yuan, K., Sun, Y., Zhou, T., McDonald, J. & Chen, Y. PARP-1 regulates resistance of pancreatic cancer to TRAIL therapy. *Clin. Cancer Res.* **19**, 4750–4759 (2013).
- Yue, L. et al. A functional single-nucleotide polymorphism in the human cytidine deaminase gene contributing to ara-C sensitivity. *Pharmacogenetics* **13**, 29–38 (2003).
- Zampieri, M. et al. ADP-ribose polymers localized on Ctcf-Parp1-Dnmt1 complex prevent methylation of Ctcf target sites. *Biochem. J.* **441**, 645–652 (2012).
- Zampieri, M. et al. Parp1 localizes within the Dnmt1 promoter and protects its unmethylated state by its enzymatic activity. *PLoS ONE* **4**, e4717 (2009).
- Zatterale, A. et al. Oxidative stress biomarkers in four Bloom syndrome (BS) patients and in their parents suggest in vivo redox abnormalities in BS phenotype. *Clin. Biochem.* **40**, 1100–1103 (2007).
- Zauri, M. et al. CDA directs metabolism of epigenetic nucleosides revealing a therapeutic window in cancer. *Nature* **524**, 114–118 (2015).
- Zerfaoui, M. et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a determining factor in Crm1-mediated nuclear export and retention of p65 NF-kappa B upon TLR4 stimulation. *J. Immunol.* **185**, 1894–1902 (2010).

- Zhang, F. *et al.* Poly(ADP-ribose) polymerase 1 is a key regulator of estrogen receptor α -dependent gene transcription. *J. Biol. Chem.* **288**, 11348–11357 (2013).
- Zhang, S. *et al.* c-Jun N-terminal kinase mediates hydrogen peroxide-induced cell death via sustained poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation. *Cell Death Differ.* **14**, 1001–1010 (2007).
- Zhang, T. *et al.* Enzymes in the NAD⁺ salvage pathway regulate SIRT1 activity at target gene promoters. *J. Biol. Chem.* **284**, 20408–20417 (2009).
- Zhang, T. *et al.* Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent gene expression through promoter-directed recruitment of a nuclear NAD⁺ synthase. *J. Biol. Chem.* **287**, 12405–12416 (2012).
- Zhang, X. & Mathews, C. K. Natural DNA precursor pool asymmetry and base sequence context as determinants of replication fidelity. *J. Biol. Chem.* **270**, 8401–8404 (1995).
- Zhang, Y. *et al.* RNF146 is a poly(ADP-ribose)-directed E3 ligase that regulates axin degradation and Wnt signalling. *Nat. Cell Biol.* **13**, 623–629 (2011).
- Zhang, Y.-W. *et al.* Poly(ADP-ribose) polymerase and XPF-ERCC1 participate in distinct pathways for the repair of topoisomerase I-induced DNA damage in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **39**, 3607–3620 (2011).
- Zhao, A., Tsechansky, M., Ellington, A. D. & Marcotte, E. M. Revisiting and revising the purinosome. *Mol. Biosyst.* **10**, 369–374 (2014).
- Zhao, H. & Piwnicka-Worms, H. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 4129–4139 (2001).
- Zhao, H., French, J. B., Fang, Y. & Benkovic, S. J. The purinosome, a multi-protein complex involved in the de novo biosynthesis of purines in humans. *Chem. Commun. (Camb.)* **49**, 4444–4452 (2013).
- Zhao, H., Watkins, J. L. & Piwnicka-Worms, H. Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 14795–14800 (2002).
- Zhao, X. & Rothstein, R. The Dun1 checkpoint kinase phosphorylates and regulates the ribonucleotide reductase inhibitor Sml1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 3746–3751 (2002).
- Zhao, X., Chabes, A., Domkin, V., Thelander, L. & Rothstein, R. The ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 is a new target of the Mec1/Rad53 kinase cascade during growth and in response to DNA damage. *EMBO J.* **20**, 3544–3553 (2001).
- Zhao, X., Muller, E. G. & Rothstein, R. A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools. *Mol. Cell* **2**, 329–340 (1998).
- Zhong, S. *et al.* A role for PML and the nuclear body in genomic stability. *Oncogene* **18**, 7941–7947 (1999).
- Zhu, J. *et al.* Small ubiquitin-related modifier (SUMO) binding determines substrate recognition and paralog-selective SUMO modification. *J. Biol. Chem.* **283**, 29405–29415 (2008).
- Zimmermann, M. & de Lange, T. 53BP1: pro choice in DNA repair. *Trends Cell Biol.* **24**, 108–117 (2014).
- Zlotorynski, E. *et al.* Molecular basis for expression of common and rare fragile sites. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 7143–7151 (2003).
- Zobeck, K. L., Buckley, M. S., Zipfel, W. R. & Lis, J. T. Recruitment timing and dynamics of transcription factors at the Hsp70 loci in living cells. *Mol. Cell* **40**, 965–975 (2010).
- Zou, Y., Liu, Y., Wu, X. & Shell, S. M. Functions of human replication protein A (RPA): from DNA replication to DNA damage and stress responses. *J. Cell. Physiol.* **208**, 267–273 (2006).
- Zuazua-Villar, P., Rodriguez, R., Gagou, M. E., Eyers, P. A. & Meuth, M. DNA replication stress in CHK1-depleted tumour cells triggers premature (S-phase) mitosis through inappropriate activation of Aurora kinase B. *Cell Death Dis* **5**, e1253 (2014).

RELATIONS FONCTIONNELLES ENTRE LE POOL DE NUCLEOTIDES ET PARP-1 : UNE NOUVELLE SOURCE D'INSTABILITE GENETIQUE.

La stabilité du génome est affectée par les déséquilibres du pool de dNTPs qui affectent notamment la vitesse de progression des fourches de réplication. Par exemple, la déficience en cytidine désaminase (CDA) conduit à un excès de dCTP qui induit un ralentissement de la vitesse des fourches de réplication. Les résultats obtenus au cours de ma thèse ont révélé un nouveau mécanisme par lequel un déséquilibre du pool de nucléotides compromet la complétion de la réplication et la ségrégation correcte des chromosomes. En utilisant des techniques de peignage moléculaire, de microscopie électronique, et d'imagerie cellulaire permettant de quantifier le niveau basal de Poly-ADP-Ribose, nous avons montré que dans les cellules déficientes en CDA, la réplication de l'ADN était incomplète à certains loci du fait de l'inhibition partielle de PARP-1, et ce indépendamment du ralentissement de la vitesse de progression des fourches de réplication. En effet, l'accumulation intracellulaire de dCTP inhibe partiellement l'activité de PARP-1, ce qui réduit l'activation de Chk1 et l'efficacité des points de contrôle qu'elle régule, favorisant l'accumulation de séquences d'ADN non répliquées en mitose. Celles-ci conduisent alors à la formation de ponts anaphasiques ultrafins (UFBs) entre les chromatides sœurs au niveau de sites difficiles à répliquer tels que les centromères et les sites fragiles communs. Ces résultats ont des implications directes dans le syndrome de Bloom (BS), une maladie génétique rare combinant prédisposition aux cancers et instabilité génétique. Ce syndrome est la conséquence de la mutation du gène *BLM*, codant pour une hélicase RecQ du même nom. La déficience en BLM conduit à une chute de l'expression de la CDA résultant en une augmentation de la fréquence des UFBs entièrement due à l'inhibition de PARP-1 par la dCTP, et ce indépendamment du statut d'expression de BLM. Ces travaux décrivent ainsi une conséquence pathologique encore inconnue du déséquilibre du pool de nucléotides et révèlent un rôle inattendu de PARP-1 dans la prévention de l'accumulation de séquences d'ADN non répliquées en mitose et des défauts de ségrégation des chromosomes associés.

Mots-clés : Cytidine désaminase, PARP-1, pool de nucléotides, UFBs, Chk1, Syndrome de Bloom, instabilité génétique.

FUNCTIONAL RELATIONSHIP BETWEEN THE NUCLEOTIDE POOL AND PARP-1 : A NEW SOURCE OF GENETIC INSTABILITY.

Genome stability is jeopardized by imbalances of the dNTP pool; such imbalances affect the rate of fork progression. For example, cytidine deaminase (CDA) deficiency leads to an excess of dCTP, slowing the replication fork. We describe here a novel mechanism by which pyrimidine pool disequilibrium compromises the completion of replication and chromosome segregation. Using molecular combing, electron microscopy and a sensitive assay involving cell imaging to quantify steady-state Poly-ADP- Ribose levels, we found that in CDA-deficient cells DNA replication was unsuccessful due to the partial inhibition of basal PARP-1 activity, rather than slower fork speed. Indeed, the intracellular accumulation of dCTP inhibits PARP-1 activity compromising the activation of Chk1 and the downstream checkpoints efficiency, allowing the subsequent accumulation of unreplicated DNA in mitosis. This unreplicated DNA leads to the formation of ultrafine anaphase bridges (UFBs) between sister-chromatids at "difficult-to-replicate" sites such as centromeres and fragile sites. These results have direct implications for Bloom syndrome (BS), a rare genetic disease combining susceptibility to cancer and genomic instability. BS results from mutation of the *BLM* gene, encoding BLM, a RecQ 3'-5' DNA helicase, a deficiency of which leads to CDA downregulation. BS cells thus have a CDA defect, resulting in a high frequency of UFBs due entirely to dCTP-dependent PARP-1 inhibition and independent of BLM status. Our results describe previously unknown pathological consequences of the distortion of dNTP pools and reveal an unexpected role for PARP-1 in preventing unreplicated DNA accumulation in mitosis and in preventing chromosome segregation defects.

Key words: Cytidine deaminase, PARP-1, nucleotide pool, UFBs, Chk1, Bloom syndrome, genetic instability.